

DMM

Aus dem Botanischen Institut in Kiel.

Über das
Vorkommen und die Verbreitung
stickstoffbindender Bakterien
im Meere.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen philosophischen Fakultät
der Königl. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt

von

Joseph Keutner

aus Rüdesheim a./Rh.

Opponenten:

Herr cand. chem. P. Horrmann,
„ cand. med. A. Philippe,
„ cand. chem. R. Schulze.



Kiel.

Druck von Schmidt & Klaunig.
1904.

Nr. 12.

Rektoratsjahr 1904/05.

Zum Druck genehmigt:

Dr. Harzer,
z. Zt. Dekan.

Meiner Mutter

in Dankbarkeit und Liebe

gewidmet.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden, im botanischen Institut zu Kiel durchgeführten Arbeit, den Nachweis des Vorkommens von Stickstoffbakterien im Meere zu erbringen.

Ehe ich zur Darstellung der eigenen Resultate schreite, will ich einen kurzen Überblick geben über unsere heutigen Kenntnisse von stickstoffbindenden Mikroorganismen auf dem Festlande, sehe dabei jedoch ab von denjenigen, welche in Symbiose mit höheren Pflanzen leben (*Leguminosenbakterien*, *Mycorhizen*).

Die ersten Angaben über stickstoffassimilierende Bakterien erhalten wir 1885 von Berthelot¹⁾. Dieser Forscher sprach schon damals die Meinung aus, daß man in jedem Ackerboden zahlreiche Mikroorganismen nachweisen kann, die imstande sind, den freien atmosphärischen Stickstoff zu binden. Er gab ferner an, daß es ihm gelungen sei, eine größere Anzahl dazu befähigter Bakterien mittelst gewöhnlicher Nährgelatine zu isolieren.

Diese letzteren Angaben stehen im Widerspruch zu den etwa 10 Jahre später veröffentlichten Resultaten Winogradsky's²⁾, der aus seinen Versuchen den Schluß zog, daß diejenigen Bakterien, welche sich auf dem genannten Nährboden isolieren lassen, durchaus unfähig sind, den freien atmosphärischen Stickstoff zu binden. Mit Hilfe der von ihm sogenannten „elektiven“ Kulturmethode ist es dem genannten Forscher jedoch gelungen, einen Bazillus (*Clostridium*) zu isolieren, welcher imstande ist, den gasförmigen Stickstoff der Luft zur Synthese von Eiweiß zu verwenden. In Nährlösungen, welche tunlichst frei waren von Stickstoffverbindungen, aber alle andere Stoffe enthielten und infiziert wurden mit geringen Mengen Erde aus dem botanischen Garten von St. Petersburg, stellte sich zunächst auf Kosten geringer Verunreinigungen der Nährlösung mit Stickstoffverbindungen, nach 3—4 Tagen ein lebhaftes Wachstum von Bakterien unter starker Trübung der Nährlösung ein. Fünf Tage später konnte man auch Gasentwicklung beobachten. Beim Öffnen der Kulturgefäße machte sich ein intensiver Buttersäuregeruch bemerkbar. Die mikroskopische Untersuchung ließ als Ursache der Gährung ein anaerobes 1,2—3 μ lang und 2 μ dickes *Clostridium* erkennen, welches in Reinkultur, im Stickstoffstrom kultiviert, reichlich (auf 1 g Dextrose 2—3 mgr N) Stickstoff zu binden vermochte, bei Sauerstoffzutritt jedoch die Fähigkeit nur dann zeigte, wenn andere Bakterien zugegen waren, die das *Clostridium* vor Sauerstoffzutritt schützten; er nannte es *Clostridium Pasteurianum*.

Die genauere Beschreibung gab der Forscher erst im Jahre 1902.³⁾

Clostridium Pasteurianum zeichnet sich besonders durch die Bildung einer höchst charakteristischen Sporenkapsel, hervorgehend aus der Mutterzellmembran, aus, durch die es von anderen *Clostridien* leicht zu unterscheiden war.

In Erdproben von Süd-Rußland wurde das genannte *Clostridium Pasteurianum* nicht nachgewiesen, wohl aber ein anderes, (*Clostridium* aus Wolhynien) größeres, zur Asporogonie neigendes *Clostridium*, dessen Reinkultivierung zwar in einwandsfreier Weise noch nicht gelang, dessen Befähigung zur Stickstoffbindung trotzdem jedoch durch Omeliansky⁴⁾ erwiesen werden konnte.

1) Comptes rendus 1885. Bd. 101. S. 175.

2) Arch. de science biol. St. Petersburg. Bd. II 1895. S. 297.

3) Bact. Ctl. II. Bd. 9. 1902. S. 43.

4) Winogradsky I. c. S. 51.

Einen wesentlichen Fortschritt bedeutet die im Jahre 1901 veröffentlichte Untersuchung Beijerinck's¹⁾, der mit Hilfe einer von Stickstoffverbindungen freien Nährlösung, die mit Gartenerde, Kanalwasser u. dergl. geimpft wurde, bis 4 μ dicke und 5—7 μ lange, aerobe Stäbchen oder Kokken-ähnliche Formen isolierte, die oft zu riesigen Diplokokken verbunden blieben, schließlich in älteren Kulturen Sarcina-ähnliche Pakete bilden konnten und in den genannten Nährlösungen eine reiche Vegetation hervorriefen.

Beijerinck benannte diese Bakteriengattung *Azotobacter* und unterschied zwei Arten, nämlich: „*Azotobacter chroococcum*“ und „*Azotobacter agilis*“. Ersterer wurde vorwiegend aus Erde, letzterer aus Kanalwasser bei Delft gewonnen.

In stickstofffreien oder armen Nährlösungen vermehrte sich *Azotobacter* so schnell, daß die nebenbei entwickelten anderen Bakterien derart zurückgedrängt wurden, daß die ganze Masse vorwiegend aus *Azotobacter* bestand. Außer den in der Flüssigkeit umherschwimmenden schleimigen Klumpen, bildeten sich an der Glaswand, im Niveau der Nährlösung, gallertartige, weißlichgelbe Anhäufungen, welche mit zunehmendem Alter eine rostbraune Färbung annahmen. Bestimmte man in einer solchen Kultur den Stickstoffgehalt, so zeigte sich, daß ein nicht unbedeutender Erwerb des gasförmigen Stickstoffes stattgefunden hatte.

Bei der von Beijerinck in Gemeinschaft mit van Delden²⁾ vorgenommenen Fortsetzung dieser Versuche wurde die Beobachtung gemacht, daß in Reinkulturen der Ertrag an gebundenem Stickstoff ein bei weitem geringerer war, wie in Rohkulturversuchen. Auch stellten die zwei Forscher fest, daß im ersten Falle der Zucker nicht aufgebraucht wurde, während im letzten die Stickstoffaufnahme mit dem vollständigen Verschwinden des Zuckers einherging. Aus dieser Tatsache schlossen sie, daß *Azotobacter* in Rohkultur die stickstoffassimilierende Tätigkeit in Symbiose mit anderen Bakterien ausübe und machten die, dem *Azotobacter* ihrer Ansicht nach, notwendigen Symbionten namhaft. Es waren dies Bakterien aus der Gattung *Granulobacter*, ferner *Aerobacter aerogenes* und *Bacillus radiobacter*.

Beijerinck ist der Ansicht, daß alle Arten der Gattung *Granulobacter* an und für sich das Vermögen besitzen, den freien Stickstoff aufzunehmen, daß jedoch diese Befähigung erst durch Symbiose mit *Azotobacter* zur Vollendung gelange; jedoch spricht er dem *Aerobacter aerogenes* sowohl wie dem *Radiobacter* für sich allein diese Fähigkeit ab.

Betrachtet man die Zahlen, die Beijerinck in Reinkultur gewann, so zeigt sich, daß der Gewinn an Stickstoffverbindungen in einem Liter höchstens 5,5 mg betrug, d. h. offenbar nur sehr wenig über die Fehlergrenze hinausging, so daß es in Frage gestellt war, ob *Azotobacter* in Reinkultur wirklich die Fähigkeit habe, Stickstoff zu assimilieren.

Im Gegensatz dazu konnten Gerlach und Vogel³⁾ den sicheren Nachweis erbringen, daß tatsächlich auch *Azotobacter chroococcum* in Reinkultur den Stickstoff zu binden imstande ist. In einer ersten Arbeit³⁾ erzielten die genannten Forscher durchschnittlich einen Gewinn von 13 mg bei Darbietung von 2 g Dextrose in einem Liter Nährlösung.

In einer weiteren Mitteilung⁴⁾ gelang es durch Darbietung von 12 g Dextrose, den Stickstoffgewinn sogar bis zu 128 mgr pro Liter zu steigern.

Auch Koch und Kröber⁵⁾ fanden bei Verwendung von Reinkulturen von *Azotobacter* den ansehnlichen Erwerb von 40—56 mg Stickstoff in einem Liter Nährlösung. Ihre Versuche stimmen jedoch insofern mit denjenigen von Beijerinck überein, als sie in Rohkulturen stets höheren Stickstoffgewinn erzielten, als in Reinkulturen.

Die Untersuchungen Freudenreich's⁶⁾, welcher ebenfalls mit *Azotobacter* arbeitete, zeigten, wie die der vorhergenannten Forscher, daß *Azotobacter* auch ohne das Vorhandensein der von Beijerinck geforderten Symbionten den freien atmosphärischen Stickstoff festlegen konnte. Freudenreich stellte unter

¹⁾ Bact. Ctl. II. Bd. VII. 1901. S. 560.

²⁾ Bact. Ctl. II. Abt. Bd. 9. 1902. S. 3.

³⁾ Bact. Ctl. II. Abt. Bd. 8. 1902. S. 669.

⁴⁾ Bact. Ctl. II. Abt. Bd. 9. 1902. S. 818.

⁵⁾ Ges. deutscher Naturforscher u. Ärzte, Verhandlungen 1902. Allg. Teil. S. 12 d. S. A.

⁶⁾ Bact. Ctl. II. Abt. Bd. 10. 1903. S. 514.

anderem seine Versuche derart an, daß er den *Azotobacter* auf mit Nährlösung getränkten Gypsplatten kultivierte.

Ich füge zum Schluß bei, daß es auch mir mit Leichtigkeit gelang, *Azotobacter chroococcum* aus diversen Erdproben des botanischen Gartens von Kiel zu isolieren und die Stickstoffbindung durch Reinkulturen nachzuweisen. (Näheres unten.)

Da wir in Bezug auf die Stickstoffbindung durch freilebende Schimmelpilze¹⁾ noch im Unklaren sind und jedenfalls die exakteren Arbeiten eine solche nicht nachweisen konnten, kommen wir zu dem Schluß, daß es bisher bloß von den beiden beschriebenen Bakteriengattungen oder nahen Verwandten feststeht, daß sie diese Fähigkeit besitzen.

Werfen wir nun noch einen Blick auf die Lebenstätigkeit der stickstoffassimilierenden Bakterien in der freien Natur und fragen wir, an welchen Standorten dieselben ihre Tätigkeit wohl entfalten können.

Zunächst ergibt sich die Unabhängigkeit der bakteriellen Stickstoffbindung von größerem oder geringerem Luftzutritt zu den Substraten aus der Verschiedenheit der Ansprüche der betreffenden Bakterien.

In sauerstofffreien Medien ist die Stickstoffbindung durch die Clostridien gewährleistet, bei Sauerstoffzutritt können, wie Winogradsky fand, diese in Symbiose mit anderen Arten arbeiten; außerdem sind durchlüftete Substrate die geeignetste Wohnstätte für *Azotobacter*. Entscheidend für diese Frage, ob die betreffenden Bakterien in Tätigkeit treten können, wird in erster Linie der Gehalt an assimilierbaren Kohlenstoffverbindungen sein.

Bezüglich dieser dürften wohl die Clostridien ziemlich anspruchsvoll sein, da *Clostridium Pasteurianum* nach Winogradsky²⁾ nur Dextrose, Lävulose, Rohrzucker, Inulin, Galactose, Dextrin vergäht, zahlreiche andere Alkohole und Zuckerarten unberücksichtigt läßt.

Andererseits ist *Azotobacter* ein ausgesprochen polyphager Organismus, so nimmt er mit vielen organischen Säuren vorlieb.

Da bekanntlich die Auswahl der Kohlenstoffnahrung in der freien Natur eine nicht allzugroße ist, so wird die Annahme erlaubt sein, daß *Azotobacter chroococcum* eine bedeutendere Rolle im Haushalt der Natur zu spielen berufen ist, als *Clostridium Pasteurianum*, soweit wir wenigstens aus den Resultaten von Reinkulturen auf das Verhalten in freier Natur schließen dürfen.

Die Bedeutung der genannten Formen für den Haushalt der Natur ergibt auch ein Blick auf ihre geographische Verbreitung: *Clostridium Pasteurianum* konnte in jeder Erdprobe des St. Petersburger botanischen Gartens, ferner in Pariser Gartenerde nachgewiesen werden. In Erde aus verschiedenen Gegenden Südrußlands wird es vertreten durch *Clostridium Wolhynicum*. Ferner ist es gelungen, das Vorkommen von *Clostridium Pasteur* sowohl in der Schweiz³⁾, als auch in Süddeutschland⁴⁾ zu konstatieren.

Was die Verbreitung von *Azotobacter chroococcum* betrifft, so wissen wir, daß derselbe mit Sicherheit zuerst in Holland nachgewiesen wurde, obwohl aller Wahrscheinlichkeit nach bereits Winogradsky⁵⁾ denselben bei seinen Versuchen mit *Clostridium* unter den Händen hatte.

Sein Vorkommen in der Schweiz, sowie in Posen zeigten die Versuche Freudenreich's⁶⁾ bzw. diejenigen von Gerlach und Vogel⁶⁾; ebenso konnte Alfr. Koch⁶⁾ die Anwesenheit jenes Bazillus sowohl in Hannover als auch in Braunschweig feststellen.

¹⁾ Vgl. die Literaturzusammenstellung bei Pfeffer, Phys. IIa. I. Bd. S. 384 ff.

Von neueren Arbeiten wären zu erwähnen:

Saida. Ber. d. d. bot. Ges. 1902. S. 107, der positive Resultate erzielt haben will.

Negative Resultate hatten:

Brefeld. Jahrbücher d. schles. Ges. f. vaterl. Kultur. Zool. bot. Sektion 1900.

Czapek. Beitr. z. chem. Phys. u. Pathol. 1902. Bd. 2.

Koch, Alfred. I. c. S. 14.

²⁾ Bact. Ctl. II. Abt. Bd. 9. 1902. S. 109. Dort auch Angaben über die Produkte der Gährung.

³⁾ Freudenreich. I. c.

⁴⁾ Behrens. Cit. nach Koch, I. c. S. 16. Derselbe fand *Clost. Past.* an den Kalksteinen, die zur Aufbesserung des Bodens in Weinberge gebracht wurden.

⁵⁾ I. c. Bact. Ctl. II. Bd. 9 1902. S. 110.

⁶⁾ I. c.

Was die Qualität des Bodens angeht, so ergaben die Untersuchungen Beijerincks, daß *Azotobacter* in zahlreichen verschiedenen Bodenarten nachgewiesen werden konnte. Auch machte er die Beobachtung, daß er in Dünen des Seestrandes vorhanden war, hingegen fehlte er in Heideböden, was auf die in denselben vorhandene, für die Entwicklung von *Azotobacter* schädliche Säure zurückzuführen sein dürfte.

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß überall auf dem Festlande, wo man gesucht hat, jene Bakterien hausen und so im Verein mit anderen Faktoren dafür sorgen, daß dauernd das Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Stickstoff gewährleistet wird. Ist es doch auch bekannt, daß die Land- und Forstwirtschaft¹⁾, ferner der Weinbau¹⁾ heutigen Tages sich bemühen, die Fähigkeit jener Bakterien durch geeignete Maßnahmen in ihren Dienst zu stellen.

So erinnere ich nur an den bekannten Versuch von Kühn²⁾, welcher 20 Jahre hindurch Roggen auf ein und demselben Acker ohne Stickstoffdüngung kultivierte und dabei normale Ernten erzielte, was ohne Zweifel nur durch Anwesenheit stickstoffbindender Bakterien im Boden möglich war. Es braucht daher nicht weiter betont zu werden, daß es nicht ohne Interesse war, die Frage nach dem Vorkommen stickstoffbindender Bakterien im Meere in Angriff zu nehmen.

Nachdem es gelungen war³⁾, nach verschiedenen Versuchen das Vorkommen der beiden oben genannten Bakterien im Meere nachzuweisen, konnte man nach zwei Richtungen die Frage weiterhin zu fördern suchen: entweder die in bekannten Meeresgegenden gefundenen Formen in ernährungsphysiologischer Hinsicht genau studieren oder aber zunächst einmal, ohne einzugehen auf physiologische Details, die Frage mehr nach der biologisch-geographischen Seite hin fördern, die natürlichen Standorte tunlichst ermitteln, und durch die Untersuchung von Wasser, Algen, Grundproben aus verschiedenen Gegenden und Tiefen ein Bild zu schaffen von der geographischen Verbreitung jener Organismen.

Ich habe hauptsächlich nach der zweiten Richtung hin gearbeitet und lege in Folgendem meine bisherigen Ergebnisse vor⁴⁾.

Analytische Methode.

Zur Kultur benutzte ich Winogradsky's „elektive“ Kulturmethode; als Nährsalze dienten Dikaliumphosphat, Magnesiumsulfat, als Kohlenstoffquelle meistens Mannit oder Dextrose, als Lösungsmittel reines, filtrierte Ostseewasser unter eventueller Zugabe bestimmter Mengen Kochsalz; ferner Leitungswasser, je nachdem das Impfmateriale aus der Ostsee, Nordsee, dem Indischen Ozean oder aus süßem Wasser stammte.

In den meisten Fällen setzte ich Kreide zu, um die durch die Clostridien erzeugte Buttersäure zu neutralisieren; auch kamen zu einigen Kulturen geringe Mengen Ammoniumsulfat.

Über Volumen und Konzentration der Nährlösungen findet man das Nähere in den bei der Besprechung der einzelnen Versuchsreihen zitierten numerierten Tabellen. Für sämtliche Versuche benutzte ich Erlenmeyerkolben von verschiedener Größe. Dieselben wurden mit Nährlösung beschickt, mittelst Watte verschlossen, im Dampfstrom bei 100° an drei auf einander folgenden Tagen keimfrei gemacht und geimpft. Die geimpften Kolben wurden bei Zimmertemperatur (15—20° bzw. 25°) aufgestellt. Zum Teil kamen sie in einen dunklen Kasten oder Schrank, einigemal auch in den Thermostaten (27—30°) zu stehen. Die Luft hatte entweder durch die Watte ungehinderten Zutritt zur Nährlösung oder wurde auch vorher mit Kalilauge und Schwefelsäure gewaschen, ohne daß dadurch das Ergebnis geändert worden wäre. Auch einige anaerobe Kulturen wurden angesetzt; es gelangten in diesem Falle die Kulturen unter geräumige Glasglocken, innerhalb derer die Luft mittelst alkalischer Pyrogallollösung von Sauerstoff befreit wurde.

Die Stickstoffbestimmungen führte ich in der Regel nach Kjeldahl aus und brachte nur dann die Methode nach Jodlbauer in Anwendung, wenn durch das Einführen größerer Mengen Schlick zugleich

¹⁾ Alfr. Koch. l. c. S. 16.

²⁾ Fühling's Landw. Ztg. 1901. Bd. 1.

³⁾ Benecke u. Keutner. Über stickstoffbindende Bakterien in der Ostsee. Ber. d. d. bot. G. 1903. Bd. 21. S. 333.

⁴⁾ Einige vorläufige Mitteilungen aus meinen Untersuchungen hat bereits Herr Prof. Reinke in folgenden Veröffentlichungen gegeben. Reinke: Die zur Ernährung der Meeresorganismen disponiblen Quellen an Stickstoff, und Reinke: Symbiose von *Vulvox* und *Azotobacter*. Ber. d. d. bot. G. Jahrg. 1903. Bd. 21. Heft 7 u. 8. S. 371 bzw. S. 1. Endlich Reinke: Zur Kenntnis der Lebensbedingungen von *Azotobacter*, ebenda Band 22. Heft II. S. 95 ff.

Salpeterstickstoff vorhanden war. Bei sämtlichen Versuchen wurde eine Anzahl Parallellösungen hergestellt, sterilisiert, mit derselben Menge Impfmateriel beimpft, hierauf die eine Hälfte der Kulturgefäße an drei aufeinander folgenden Tagen abermals sterilisiert, schließlich nach beendeter Versuchsdauer der Inhalt sämtlicher Kolben analysiert. Durch Abziehen des in dem sterilen Kolben gefundenen Stickstoffgehaltes von dem des geimpften, ergab sich die durch Bakterientätigkeit gebundene Menge Stickstoff. Zur Bestimmung der letzteren wurden sämtliche Kulturgefäße einer Reihe mit gleichen Mengen, meist 10 ccm Kjeldahl'scher Schwefelsäure versetzt und unter Nachspülen mit 100 ccm destilliertem Wasser in geräumige Kolben aus Jenenser Glas gebracht. Die Zersetzung geschah in üblicher Weise in schräg stehenden Kolben. Nach dem Hinzufügen von 0,7 g Quecksilber als Kontaksubstanz und einigen Tönstückchen, welche letztere den Zweck hatten, ein zu starkes Aufstoßen der Flüssigkeit und Zerspringen des Kolbens zu verhindern, wurde mit ganz schwacher, allmählich immer stärker werdender Flamme erhitzt. Nach Verlauf von etwa einer Stunde konnte man an der Schwarzfärbung des Zuckers, welcher nach und nach in Schäumung geriet, beobachten, daß das Wasser verdunstet war und nun die Wirkung der konz. Schwefelsäure einsetzte. Von diesem Zeitpunkte an ist es unerlässlich, die breiige Masse unter öfterem Umschwenken in Bewegung zu halten, da es sonst leicht geschieht, daß ein Teil durch das Schäumen an die obere Wandung des Kolbens, also außer den Wirkungsbereich der Schwefelsäure gebracht wird und dort so fest anbakt, daß er später durch die Säure nicht mehr zersetzt werden kann. Sobald die Flüssigkeit vollständig farblos geworden ist, erhitzt man noch eine Viertelstunde. Nun erst ist die Zersetzung als beendet anzusehen. Zur Überführung der erstarrten weißen Masse in den zur Destillation bestimmten, ebenfalls aus Jenenser Glas bestehenden Literkolben werden 300 ccm destilliertes Wasser verwandt. Der Destillationskolben wird alsdann mit einem doppelt durchbohrten Kautschuckstopfen geschlossen. Die eine Durchlochung trägt ein bis auf den Boden des Kolbens reichendes, nach oben hin sich in eine Kugel erweiterndes, durch einen Glashahn verschließbares Rohr, während die andere eine Stutzer'sche Kugeldestillationsröhre trägt. Zur Aufnahme der vorgelegten $\frac{n}{20}$ Schwefelsäure benutzte ich einen möglichst hohen Erlenmeyerkolben, der in schräger Lage befestigt wurde, um das Herausspritzen von Flüssigkeit während der Destillation zu verhüten. Die Austreibung des Ammoniaks erfolgt durch 50 ccm Natronlauge (1:1). Man führt dieselbe mittelst des oben erwähnten erweiterten Kugel-Rohres unter Umschwenken in die saure Flüssigkeit ein und läßt schließlich 8 ccm einer Schwefelkaliumlösung (1:10) zufließen. Hierauf wird ohne Kühlung destilliert und durch immer stärkeres Erhitzen die Temperatur so gesteigert, daß die Dämpfe durch die Säure der Vorlage streichen, die Flüssigkeit zum Sieden bringen und dieselbe dadurch von der vorhandenen Kohlensäure befreien. Nach dreiviertelstündigem Erhitzen wird der Erlenmeyerkolben abgenommen, die eintauchende Röhre mit destilliertem Wasser abgespült und der Säureüberschuß nach völligem Erkalten mit $\frac{n}{20}$ Natronlauge festgestellt. Als Indikator benutzte ich einige Tropfen einer Lösung von Lackmoid und Malachitgrün; titriert wurde mit Glashahnbüretten, welche an der hinteren Wand einen blauen Längsstreifen trugen, um so ein genaueres Ablesen zu erleichtern. Bei dem Einstellen der Normallösung ging ich von der Oxalsäure aus und bestimmte zum Titrieren einer jeden Versuchsreihe jedesmal den Faktor der Natronlauge und Schwefelsäure. Auch wurde die Reinheit der Reagentien, welche sämtlich von Kahlbaum bezogen waren, durch Blankobestimmungen festgestellt. Die Genauigkeit, mit welcher der Apparat arbeitete, zeigten Bestimmungen von Ammoniumchlorid und Natriumnitrat, bei welchen Salzen der Stickstoffgehalt genau gefunden werden konnte. Schließlich ist noch zu bemerken, daß ich das zur Analyse notwendige Wasser stets kurz vorher überdestillierte und die zuerst übergehenden Partien verwarf.

Durchschnittlich fand ich bei Blankobestimmungen 0,3 mg Stickstoff in 100 ccm Ostseewasser mit den üblichen Nährstoffen. War 0,5 g Erde als Impfmateriel verwandt, so konnte der anfängliche Stickstoffgehalt auf etwa 1½ mg pro 100 ccm Nährlösung steigen, woraus zu folgern ist, daß ein erheblicherer Gehalt an Stickstoff auf die Tätigkeit von Stickstoffbakterien zurückzuführen war. Um diesen Schluß ganz sicher zu stellen, impfte ich eine Kultur mit *Penicillium crustaceum*, d. h. einem Organismus, der freien Stickstoff nicht bindet. Tatsächlich fand ich, daß nach beendeter Kulturdauer der Stickstoffgehalt des geimpften Kolbens, in dem der Pilz nur kümmerlich gewachsen war, den eines sterilen Parallelkolbens nicht übertraf, daß andererseits ein dritter Kolben, der mit *Azotobacter* beimpft worden war, ca. 5 mg

gebundenen Stickstoff enthielt. Ein vierter Versuch, in dem *Azotobacter* und *Penicillium* eingepflegt wurden, gab ebenfalls Stickstoffgewinn, aber etwas weniger als die *Azotobacter*-Reinkultur (3,5 mg).¹⁾

Ich will nun an der Hand einer von mir ausgeführten Bestimmung die analytische Methode etwas näher ins Auge fassen und ihre Zuverlässigkeit nachweisen. Zu diesem Zwecke wähle ich Versuch Nr. 3 auf Tabelle Nr. 7. Die geimpfte sowie sterile Kultur wurden genau in der oben beschriebenen Weise behandelt. Nach vollendeter Destillation und erfolgter Abkühlung der vorgelegten Schwefelsäure wurde die Titrierung vorgenommen. Die $\frac{n}{20}$ Natronlauge stimmte mit der $\frac{n}{20}$ Oxalsäure überein.

Die $\frac{n}{20}$ Schwefelsäure hatte den Faktor 1,3 d. h. jedes ccm der vorgelegten $\frac{n}{20}$ Schwefelsäure mußte mit 1,3 multipliziert werden, um einer $\frac{1}{20}$ Normallösung zu entsprechen.

	Bei der geimpften Kultur	Bei der sterilen Kultur
Vorgelegt wurden	20 ccm $\frac{n}{20}$ d. h. $20 \text{ ccm} \times 1,3$ = 26 ccm $\frac{n}{20}$ Schwefelsäure	20 ccm $\frac{n}{20}$ d. h. $20 \text{ ccm} \times 1,3$ = 26 ccm $\frac{n}{20}$ Schwefelsäure
Zum Zurücktitrieren wurden gebraucht	11,7 ccm $\frac{n}{20}$ Natronlauge	25,6 ccm $\frac{n}{20}$ Natronlauge
Es wurden demnach durch Ammoniak neutralisiert	14,3 ccm $\frac{n}{20}$ Schwefelsäure	0,4 ccm $\frac{n}{20}$ Schwefelsäure
1 ccm $\frac{n}{20}$ Schwefelsäure entspricht 0,0007 g Stickstoff, also entsprechen	14,3 ccm = $14,3 \times 0,0007$ = 10,1 mgr Stickstoff = rund 10 mgr Stickstoff	0,4 ccm = $0,4 \text{ ccm} \times 0,0007$ = 0,28 mgr = rund 0,3 mgr Stickstoff
Der Ertrag an gebundenem Stickstoff in Kultur III war demnach . . .	10 — 0,3 = 9,7 mg Stickstoff.	

Ich beschreibe jetzt einige Versuche, durch die ich mich orientieren wollte, an welchen Standorten im Meere die stickstoffbindenden Bakterien hauptsächlich zu treffen sind, ob frei im Meerwasser, ob am Meeresgrunde oder auf anderen lebenden oder toten Organismen haftend.

Ich beschickte zu diesem Zwecke 10 Erlenmeyerkolben mit Mannit und den zum Wachstum von *Azotobacter* notwendigen stickstofffreien Nährsalzen, gelöst in 10 ccm Wasser und sterilisierte an drei aufeinander folgenden Tagen im Dampfstrom bei 100°. Als dann filtrierte ich in jeden Kolben 100 ccm frischgeschöpftes Meerwasser durch ein steriles Filter. Als Filtrierpapier dienten verschiedene, von der Firma Schleicher & Schüll bezogene Proben. Den Rückstand eines jeden Filters, welcher sich nach dem Durchlaufen von weiteren 900 ccm Meerwasser ansammelte, spülte ich in je einen der fünf Parallelkolben und füllte letztere ebenfalls zu 100 ccm auf. Die Kulturen wurden 6 Wochen hindurch bei Zimmertemperatur (15—20°) aufbewahrt. Während dieser Zeit konnte man in den Kolben, welche mit dem Filtrerrückstande geimpft worden waren, ein üppiges Wachstum von Bakterien wahrnehmen. Die Kolben der Parallelreihe blieben klar.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß in den getrübbten Kolben sowohl *Azotobacter* als auch *Clostridien* vorhanden waren, während in den übrigen Kulturen kein Wachstum von Organismen nachgewiesen wurde.

¹⁾ Ein ähnliches Resultat der Hemmung der Stickstoffbindung durch Gegenwart von *Penicillium* erzielten Gerlach und Vogel, vergl. Bact. Ctl. II. Bd. X. 1903. S. 641/42.

Es war nun noch weiter zu entscheiden, ob das Sterilbleiben der mit filtriertem Wasser gefüllten Kolben darauf zurückzuführen war, daß *Azotobacter* infolge seiner relativen Größe von dem Filter zurückgehalten wurde oder aber darauf, daß er auf größeren Organismen sitzt, die ihrerseits nicht durch das Filtrierpapier hindurchgehen. Letztere Annahme fand ich durch die von mir ausgeführten, nun folgenden Filtrationsversuche bestätigt.

Ich brachte einen Teil einer *Azotobacter*-Rohkultur in ein mit Glasstopfen verschlossenes Fläschchen und schüttelte die Flüssigkeit derart, daß die Zellen sich von einander trennten und möglichst gleichmäßig darin verteilt waren, brachte alsdann die trübe Masse auf Filter von derselben Qualität wie bei den vorhergehenden Versuchen und untersuchte die durchgelaufene Flüssigkeit auf die Anwesenheit von *Azotobacter*.

Als Resultat war zu verzeichnen, daß ich in zahlreichen, von mir untersuchten Proben, jedesmal den *Azotobacter* im Filtrat antreffen konnte. Hieraus folgte, daß letzterer bei den oben beschriebenen Versuchen unbedingt auf größeren Organismen des Plankton gegessen haben muß.

Um einem Mißverständnis vorzubeugen, möchte ich bemerken, daß ich keineswegs behaupten will, daß jener Spaltpilz niemals im Wasser, sondern immer nur auf Organismen nachzuweisen sei; jedoch ist es nicht ausgeschlossen, daß *Azotobacter* vorwiegend auf Organismen vorkommt, indem er dort reichlicher Nahrung findet als in dem Wasser selbst, daß er jedoch ähnlich wie die Leuchtbakterien, welche auf den Leibern toter Fische leben, durch den Wellenschlag und andere äußere Umstände von seinem natürlichen Substrat losgerissen wird und daher ab und zu auch direkt im Wasser nachgewiesen werden kann.

Aus diesen Resultaten ergibt sich nun die Disposition für meine Arbeit.

Ich betrachte zunächst das Vorkommen von *Azotobacter* und anderen stickstoffbindenden Bakterien am Meeresgrund, hierauf an festgewachsenen Algen, schließlich an Organismen des Planktons.

Schlickkulturen.

Ich bespreche zuerst die Kulturen, deren Impfmateriel aus der Kieler Bucht stammt und schließe hieran diejenigen aus anderen Gegenden der Ostsee, ferner aus der Nordsee und dem Indischen Ozean an. Falls Ostseeschlick als Impfmateriel diente, wurde derselbe gewöhnlich in der Gegend der Heulboje oder in der Nähe des Feuerschiffes am Ausgange der Kieler Fördrde mittelst eines schweren, vorher steril gemachten, eisernen Hohlzylinders heraufgeholt. Letzterer war an dem einen Ende mit einem Stück Leinwand überbunden. Der auf diese Weise heraufgebrachte Schlick, der bald schwarz, bald grau aussah, wurde alsdann in sterile, mit Wattepfropf verschlossene Flaschen übergeführt, um von hier aus mittelst einer sterilen Platinöse oder eines ebenfalls steril gemachten Wägegläschens in die bereits keimfrei gemachten Nährlösungen eingimpft zu werden.

Über die genaue Zusammensetzung der Kulturflüssigkeiten findet sich das Nähere in den am Schluß der Arbeit folgenden Tabellen.

Die ersten Untersuchungen über Schlickproben wurden im Februar 1903 in Gang gesetzt. Die in oben erwähnter Weise hergestellten, beimpften Kolben zeigten bereits nach drei bis vier Tagen eine schwache Trübung. Einige Tage später konnte man die Bildung eines dünnen, an der Oberfläche der Nährlösung umhertreibenden Häutchens, wahrnehmen. Gleichzeitig wurde ein immer stärker werdendes Aufsteigen von Gasblasen beobachtet. Die in einigen Fällen zugesetzte Kreide löste sich allmählich auf, ein sicheres Zeichen dafür, daß eine Säure ausgeschieden wurde. An der Innenwandung des Kulturgefäßes, etwa im Niveau der Nährlösungen, bildete sich eine gallertartige, schleimige, schmutzig-gelbe, mit dem Alter braun werdende Masse. Man beobachtete, daß in Mannitlösungen derartig gelblich-braune Anhäufungen jene in Dextrosekulturen an Ausdehnung bedeutend übertrafen. Sie bildeten förmlich einen, an der Glaswand haftenden, vollständig in sich geschlossenen Ring von der Dicke eines Bleistiftes. Auch darin zeigte sich ein Unterschied, daß bei Kulturen mit Dextrose die Gährung in der Regel eher einsetzte und stets eine intensivere war, als bei Nährlösungen, welche Mannit als Kohlenstoffquelle enthielten. Dasselbe konnte man auch bei Schlickkulturen, im Gegensatz zu Planktonkulturen, beobachten. Bemerkenswert ist ferner, daß in den Gefäßen mit hoher Flüssigkeitssäule die Gährung eine kräftigere war, als bei solchen mit einer weniger hohen.

Beim Entfernen des Wattepfropfens von den Kulturkolben wurde ein unreiner, wenig angenehmer Buttersäuregeruch wahrgenommen. Kurz gesagt, es traten nach dem Impfen mit Schlick in eine geeignete Nährlösung dieselben Erscheinungen auf, wie sie in den Untersuchungen Winogradsky's¹⁾ und Beijerinck's¹⁾ geschildert wurden. Wie wir aus der Tabelle Nr. 2 und 3 ersehen, ergab die analytische Stickstoffbestimmung eine reichliche Zunahme an gebundenem Stickstoff. Auch wirkte die Zugabe von Kreide sehr günstig, was sich bei der kräftigen Buttersäuregärung voraussehen ließ. Ferner wurde in den Fällen, in welchen geringe Mengen stickstoffhaltiger Salze anfänglich zugegeben wurden, der Ertrag an gebundenem Stickstoff bedeutend in die Höhe getrieben. Die einzelnen Zahlen zeigen zwar unter sich wesentliche Unterschiede; jedoch darf dies bei Mischkulturen nicht Wunder nehmen, da auch andere Forscher zu denselben Resultaten kamen. Die Zugabe von 4 g Dextrose oder Mannit in die Nährlösungen muß als etwas zu hoch angenommen werden, indem keiner der beiden Nährstoffe vollständig aufgebraucht war.

Es lag zunächst die Frage nahe, ob in meinen Kulturen dieselben Organismen wie in den von Beijerinck und Winogradsky tätig waren oder ob es sich um andere, vielleicht speziell an Meerwasser angepaßte Formen, handelte.

Diese Frage wurde mit Hilfe von Kulturen in folgender Weise zu beantworten gesucht.

Ich stellte eine Reihe stickstofffreier Nährlösungen her, welche als Lösungsmittel teils Meer-, teils Leitungswasser enthielten. Die Meerwasserkulturen wurden hierauf mit Gartenerde und diejenigen Kulturen, welche Leitungswasser enthielten, mit Meeresschlick beimpft. Nach kurzer Zeit konnte man in sämtlichen Kulturen gleichartiges Wachstum und dieselben Gärungserscheinungen beobachten. Der mikroskopische Befund bestätigte die aus diesem Kulturverlauf herausgelesene Vermutung, daß es sich um dieselben oder nahe verwandte Organismen, wie sie auf dem Lande vorkommen, handelte.

Es zeigte sich, daß die bereits auf dem Festlande durch ihre stickstoffbindende Tätigkeit bekannten Formen vorhanden waren.

Die Art und Weise, wie die Identifizierung jener Bakterien mit den genannten Formen ermöglicht wurde, soll zum Schluß der Arbeit in dem Kapitel: „Speziellere Eigenschaften der stickstoffbindenden Bakterien“ genauer dargelegt werden. Hier mögen folgende kurze Angaben genügen.

Man konnte stets beobachten, daß *Azotobacter Chroococcum* ein besonders üppiges Wachstum in Mannitkulturen entfaltete; auch waren die im Niveau der Nährlösung an der Glaswand gebildeten, gelblich-weißen Massen der Hauptsache nach auf die Anwesenheit unzähliger *Azotobacter*zellen zurückzuführen, während die Clostridien, die keineswegs fehlten, in den Kulturen mit Dextrose zu kräftigerem Wachstum Veranlassung gaben.

Als aerobe Form übt demnach *Azotobacter* seine stickstoffassimilierende Tätigkeit mehr in der Oberfläche der Kultur aus, während *Clostridium Past.* als bekanntlich obligat anaerobiotisches Buttersäurebakterium, stets am Boden der Nährlösung anzutreffen ist. Es bildet daselbst graulich-weiße „Kefirkorn ähnliche“, oft Kahlhautartige Fetzen, welche zuweilen durch die aufsteigenden Gasblasen an die Oberfläche gerissen werden.

Ob und wie weit die zahlreich anderen, nebenbei auftretenden Bakterien sich an der Stickstoffassimilation beteiligen oder auch in der einen oder anderen Weise die stickstoffbindende Tätigkeit von *Azotobacter* und *Clostridium* zu fördern im Stande sind, kann nur durch die entsprechenden Reinkulturversuche entschieden werden.

Nachdem hiermit der Beweis erbracht ist, daß eine stickstofffreie Nährlösung durch Infektion mit geringen Mengen Meeresschlick aus der Kieler Bucht sich beträchtlich auf Kosten von freiem atmosphärischem Stickstoff anreichert, nachdem ferner das Vorhandensein von *Clostridium Pasteurianum* und *Azotobacter chroococcum* nachgewiesen worden ist, lag die Frage sehr nahe, ob auch solche Bakterien in Meeresschlickproben anderer Gegenden von derselben physiologischen Befähigung vorhanden seien.

Ich untersuchte solche Proben, welche aus anderen Teilen der Ostsee, Nordsee und des Indischen Ozeans stammten. Dabei benutzte ich die Gelegenheit, auch einige vorläufige Erfahrungen zu sammeln über das Vorkommen von *Azotobacter* oder ähnlichen Organismen auf dem Festlande anderer Kontinente.

¹⁾ l. c.

Zunächst gebe ich eine Liste von den betr. Erdproben bzw. Meeresschlickproben und ergreife mit Freuden die Gelegenheit, allen den Herren, die meine Studien durch Übersendung solcher Proben unterstützten, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Es sandte mir Herr Schmidt (I. Offzier der Bremer Hansa-Linie):

- I. Schlick aus der Haigo-Reede in Finnland, aus einer Tiefe von 9 m.
- II. Schlick von der Schwedischen Küste unweit Bornholm, aus 43 m Tiefe.
- III. Schlick aus der Reede von Sprogø (großer Belt), aus 21 m Tiefe.
- IV. Schlick aus der Reede von Dartmouth, aus 21 m Tiefe.
- V. Schlick aus der Reede von Hals (Eingang zum Lym-Fjord), aus 7 m Tiefe.

Ferner erhielt ich von Herrn Sperling, Kaiserliches Bezirksamt Tanga, durch die liebenswürdige Vermittlung von Herrn Prof. Zimmermann, Meeresschlick aus verschiedenen Stellen des Hafens von Tanga. Es waren dies:

- I. Meeresboden aus Tanga, bei tiefer Ebbe entnommen, 150 m vom Strande immer von Meerwasser bedeckt, von Grundwasser unbeeinträchtigt.
- II. Meeresboden aus dem Hafen von Tanga, unterhalb des Kaisergartens, an der Mündung eines Grundwasserstromes; bei Ebbe von Süßwasser aus Quellen bespült, bei Flut von Meerwasser bedeckt.
- III. Meeresproben von der Hafeneinfahrt zu Tanga, bei Ebbe entnommen.
- IV. Schlick aus dem Hafen von Tanga 150 m vom Strande, bei tiefer Ebbe von Wasser nicht bedeckt, eine Handbreit unter der Oberfläche entnommen, von Süßwasser nicht beeinträchtigt.

Herr Prof. Zimmermann sandte mir einige Proben aus dem Versuchsgarten der biologischen Station Amani (Ostafrika).

Herrn Direktor Treub verdanke ich Schlickproben aus dem Hafen von Tandjong Priok; ferner Erdproben aus dem botanischen Garten Buitenzorg auf Java.

Die sämtlichen, von den verschiedenen Gegenden entstammenden Proben, kamen in fest verschlossenen Gläsern an. Verschieden große Mengen davon wurden kurz nach ihrem Eintreffen unter der peinlichsten Vermeidung einer Infektion in die sterilen Nährlösungen übergeimpft. Letztere stellte ich in der üblichen Weise her; es diente als Lösungsmittel Leitungswasser resp. auch Ostseewasser mit einem Zusatz von 1,5% Kochsalz bei den Kulturen aus dem Indischen Ozean. Auch diese Kulturen wurden tunlichst bei erhöhter Zimmertemperatur (20°) aufgestellt. Nach kaum fünf Tagen konnte man bei allen geimpften Kulturen das Eintreten von Wachstum beobachten. Die Flüssigkeit trübte sich und bald setzte auch eine Gärung ein. An der Innenwandung der Gefäße bildete sich der oben beschriebene Gallertring. Das Mikroskop zeigte in sämtlichen Kulturen die Gegenwart von *Azotobacter chroococcum* und *Clostridien*, die entweder ähnlich oder identisch mit *Clostridium Pasteurianum* waren.

Der quantitativen Analyse wurden sämtliche Kolben (mit Ausnahme der aus Ost- und Nordsee stammenden) unterworfen. Sie gaben einen recht ansehnlichen Erwerb an gebundenem Stickstoff (zur genauen Orientierung siehe Tabelle Nr. 4, auf welcher außer der Anzahl der Kulturtage und Konzentration der Nährlösungen auch die analytischen Resultate zu ersehen sind). Ein äußerst kräftiges Wachstum und einen besonders hohen Stickstoffgewinn zeigten die dem Indischen Ozean entstammenden Bakterien.

Aus den bisher gemachten Erfahrungen ergibt sich demnach, daß in allen von mir untersuchten Schlickproben aus verschiedenen Gegenden der Erdoberfläche, stets *Azotobacter* und *Clostridium* zugegen waren und daß die mit jenen Proben infizierten Nährlösungen nach einigen Wochen einen beträchtlichen Stickstoffgewinn aufzuweisen hatten.

Kulturen mit Impfmateriel von festsitzenden Algen.

Nach Erledigung der Untersuchung von Schlickkulturen will ich nun auf die Versuche eingehen, bei welchen mit Teilen festsitzender Algen geimpft wurde. Zur vorläufigen Orientierung impfte ich bei Gelegenheit des Einsammelns der Schlickproben in der Kieler Bucht zwei bereitstehende Kulturflaschen mit je einem kleinen Thallus-Stückchen von *Hydrolapathum sanguineum*. Die Kulturgefäße wurden bei Zimmertemperatur (20—25°) aufgestellt. Nach dem Verlauf von 3 Tagen bemerkte man, daß die kleinen, einge-

impften, am Boden liegenden Fetzen sich mit einem dünnen Häutchen überzogen, welches letzteres an Ausdehnung immer mehr zunahm. Bis dahin war die Flüssigkeit vollständig klar; auch konnte man eine Auflösung der zugesetzten Kreide nicht beobachten. Nach weiteren 7 Tagen hatte die Nährlösung bereits eine durch Bakterien hervorgerufene Trübung erfahren. Es bildete sich nun auch auf der Oberfläche der Nährlösung ein dünnes Häutchen. Letzteres wurde immer größer und stieß nach einigen Tagen an der Glaswand an. Die weitere Entwicklung war ganz dieselbe, wie die bei den Schlickkulturen geschilderte, doch trat die Gasentwicklung später ein und zwar erst dann, als der Gallertring an der Innenwandung des Gefäßes bereits gebildet war und die Flüssigkeit sich deutlich getrübt hatte.

Auch die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß sowohl *Clostridium* als auch *Azotobacter* vorhanden waren. Jedoch konnte man beobachten, daß *Azotobacter* stärker vertreten war, als in den Schlickkulturen. Er war auch hier hauptsächlich an der Oberfläche zu finden. Außerdem bildeten sich im unteren Teile der Flüssigkeit, dicht an der Wandung des Gefäßes herabhängende, über den Boden sich hinziehende Kahmhäute. Letztere bestanden in den oberen Partien fast nur aus *Azotobacter*-zellen, während die unteren Teile mehr oder weniger mit *Clostridien* und stäbchenförmigen Bakterien untermischt waren.

Wie aus Tabelle Nr. 5 zu ersehen ist, hat ein ganz ansehnlicher Stickstoffgewinn in den einzelnen Kulturen stattgefunden.

Nachdem nun die Tatsache, daß *Azotobacter* an der Oberfläche von *Hydrolapathum sanguineum* lebt, festgestellt wurde, war es wichtig zu erfahren, ob andere Algen, sowie auch Tiere des Meeresgrundes sich ebenso verhielten.

Als weitere Versuchsobjekte dienten außer *Hydrolapathum sanguineum*, *Polysiphonia elongata*, *Cystoclonium purpurascens*, *Fucus serratus*, *Laminaria flexicaulis*, sämtlich aus der Ostsee; ferner ein *Seestern* und ein *Mytilus*.

Kleine Stückchen davon wurden genau abgewogen, in Parallelkulturen gebracht, und nachdem die Parallelreihe nochmals sterilisiert war, bei Zimmertemperatur (20–25°) sich selbst überlassen.

Wie zu erwarten war, fingen die Kulturen bald an sich zu trüben. Wiederum bemerkte man, daß sich das eingimpfte Fetzen eines Algentallus mit einem dünnen Häutchen überzog. Der weitere Vorgang war ganz analog dem vorher beschriebenen mit *Hydrolapathum*.

Die mikroskopische Untersuchung stellte die Anwesenheit von *Azotobacter chroococcum* und *Clostridium Pasteurianum* in sämtlichen Kulturen fest. Auch hierbei konnte man die Beobachtung machen, daß *Azotobacter* stets in der Überzahl vorhanden war.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl bestätigte die Annahme, daß eine Bindung des atmosphärischen Stickstoffs stattgefunden hatte. Wie wir aus Tabelle Nr. 5 ersehen, ist letzterer ein sehr beträchtlicher.

Da *Azotobacter* sich derart rasch und kräftig entwickelte, daß in kurzer Zeit die ganze, in der Flüssigkeit umhertreibende, organische Masse zum größten Teil aus *Azotobacter*-zellen bestand, lag die Vermutung sehr nahe, daß es möglich sei, jenen so charakteristischen Spaltpilz direkt mikroskopisch in dem Schleime der Algen nachzuweisen.

Ich schabte mit einem Skalpell vorsichtig den Schleim von der betr. Alge ab und betrachtete ihn unter dem Mikroskop. Dabei ist es mir einigemale gelungen, die eigenartig gestalteten *Azotobacter*-zellen ganz deutlich nachzuweisen; außer auf *Hydrolapathum sanguineum* ganz besonders auf *Laminaria flexicaulis*, auf welcher letzterer Pflanze dieser Organismus besonders reichlich vertreten war. Auch in den mit Bruchstücken von *Seesternen* und *Mytilus* angesetzten Kulturen konnte ich die Gegenwart von *Azotobacter* und *Clostridium* feststellen.

Das Ergebnis, daß stickstoffbindende Bakterien auf den festsitzenden Algen der Ostsee vorkamen, veranlaßte mich Versuche anzustellen mit Algen aus der Nordsee. Zu diesem Zwecke wurden von der biologischen Station zu Helgoland durch Herrn Dr. Kuckuk einige Algen übersandt.

Es waren dies: *Plocamium coccineum*, *Furcellaria fastigiata*, *Desmarestia aculeata*, *Chondrus crispus*, *Lithothamnion Sanderi*, *Fucus serratus*, *Corallina vulgaris*, *Delesseria alata*, *Polyides rotundus*, *Dictyota dichotoma*, *Halidrys quadrivalvis*, *Laminaria saccharina*, *Scytosiphon lomentarius*, *Enteromorpha linza*, *Porphyra laciniata*, *Ceramium rubrum*.

Die Glashäfen, welche die Algen enthielten, waren dicht mit Pergamentpapier überbunden und kamen in gutem Zustande hier an.

Von sämtlichen Algen wurden kleine Teilchen in der üblichen Weise in sterile, 3% Chlornatrium enthaltende Nährlösungen gebracht. Es zeigte sich, daß die Kulturen im wesentlichen den gleichen Verlauf wie die oben geschilderten Ostseekulturen ergaben.

Mit Hilfe des Mikroskopes konnte das Vorhandensein der beiden bekannten stickstoffbindenden Bakterien in den Kulturen festgestellt werden. Sie stimmten auch in allen Eigenschaften mit den aus der Ostsee durch Kultur isolierten, überein. Auch von den Nordseekulturen wurden einige als quantitative Versuche in der oben geschilderten Weise angesetzt und nach Ablauf der Kultur analysiert. Die Analyse ergab, wie aus Tabelle Nr. 6 ersichtlich, einen bemerkenswerten Stickstoffgewinn. Ich fand indessen, daß die Aufnahme von gebundenem Stickstoff bei den Ostseekulturen eine bedeutendere war, als bei den Nordseekulturen.

Dies beruht einerseits auf der kürzeren Versuchsdauer. (Vergleiche darüber die Tabellen.) Anderenteils ist dies dem Umstande zuzuschreiben, daß die Versuchsreihe mit Nordseealgen im Winter ausgeführt wurde, während die Bakterien in den Ostseekulturen unter den günstigeren Wärmebedingungen des Sommers standen. Wir wissen somit, daß auf zahlreichen Algen aus der Ost- und Nordsee jene Bakterien zu finden sind, welche durch ihre Fähigkeit, den Stickstoff zu assimilieren, bereits von ihrem Vorkommen im Erdboden her, bekannt sind.

Es bleibt uns jetzt noch übrig, die Frage des Vorkommens von *Azotobacter* und *Clostridium* auf Planktonorganismen zu erörtern, nachdem die obengenannten Filtrationsversuche schon die Gegenwart derselben auf Plankton erwiesen haben.

Planktonkulturen.

Es wurde zunächst ein mit stickstofffreier Nährlösung beschickter Kolben mit einer Platinöse voll gemischtem Plankton, welches im Juli 1902 bei der Heulboje gesammelt worden war, geimpft¹⁾. Das Plankton fischte ich mit einem Netze, welches mit Filtrierpapier fest umbunden steril gemacht worden war und erst draußen auf offener See, kurz vor dem Einwerfen, von letzterem befreit wurde. Die Kultur stellte ich bei Zimmertemperatur (20—25°) auf. Bereits nach 6 Tagen begann die Flüssigkeit sich zu trüben und wenige Gasblasen zeigten den Anfang einer Gärung.

Die mikroskopische Untersuchung ergab auch hier tatsächlich die beiden bekannten Bakterien. Bei genauerer Beobachtung konnte ich feststellen, daß *Azotobacter* bei weitem stärker vertreten war als *Clostridium*.

Vergleichen wir diesen Entwicklungsgang mit solchen Kulturen, bei welchen Schlick einerseits und Algen andererseits als Impfmateriale dienten, so sehen wir, daß er am meisten Übereinstimmung zeigt mit den Vorgängen, wie wir sie bei den Algenkulturen beobachten konnten. Sowohl hier, als auch bei den Kulturen mit Algenteilen der Ost- und Nordsee, bildete sich zuerst der Gallertring, ehe eine Bildung von Gasblasen wahrzunehmen war. Auch zeigte sich insofern eine große Ähnlichkeit, als der Buttersäuregeruch bedeutend schwächer war, als in den Schlickkulturen.

Für die weiteren Plankton-Kulturen benutzte ich als Impfmateriale sowohl je eine Platinöse der oben beschriebenen Kultur, als auch geringe Mengen kurz vorher gefischten Planktons, das an verschiedenen Stellen und zu verschiedenen Jahreszeiten in der Ostsee gesammelt worden war. Im Sommer waren es vorwiegend *Diatomeen*; einige im Herbst angesetzte Kulturen wurden mit fast reinem *Peridineen*-Plankton beimpft. (Alles Nähere s. Tabelle Nr. 7—11.)

Speziellere Eigenschaften der stickstoffbindenden Bakterien.

Ich wende mich in diesem Kapitel der Aufgabe zu, eine Schilderung zu entwerfen von der Bakterienflora, die sich in den Rohkulturen entwickelte. Im Anschluß daran teile ich einige, mit Reinkulturen gewonnene Ergebnisse mit und füge bei einige Beobachtungen über den Einfluß der Zeitdauer und der

¹⁾ Dies war somit der erste Versuch der mir das Vorkommen von stickstoffbindenden Bakterien im Meere zeigte.

Konzentration der Nährlösung auf die Stickstoffbindung. Dieselben beanspruchen nur als Ergänzungen zu den bereits vorliegenden und als Vorarbeiten für die zukünftigen Untersuchungen anderer Forscher zu gelten.

Zunächst bespreche ich die Formen der *Azotobacter*-Gruppe.

Das erste Auftreten des *Azotobacter* ist in Kulturen der üblichen Zusammensetzung, die bei 30° gehalten wurden, nach ca. 48 Stunden mikroskopisch nachzuweisen. Ein dünnes, auf der Oberfläche treibendes Bakterienhäutchen, zeigte neben vielen anderen Formen auch vereinzelte, die besonders durch ihre Größe in die Augen springen. Dieselben sind teilweise in Ruhe, teilweise bewegen sie sich auch lebhaft hin und her. Oft bleiben sie mit ihren Cilien an irgend welchen Gegenständen der Kahlhaut haften, um sich dann nach lebhafter kreisender Bewegung loszureißen und fortzueilen. Jodzusatz färbt den Zellinhalt gelblich. Ihre Form ist bald rundlich, bald kurzstäbchenförmig. Teilungsbilder sind häufig zu beobachten. Die Größe wechselt stark. Im Durchschnitt beträgt sie etwa 2–4 μ . Daneben kommen einige auffallend große Formen vor; außerdem auch weit kleinere, deren Durchmesser weniger als ein μ beträgt. Nach dreimal 24 Stunden beobachtete ich die genannten Bakterien schon in weit größerer Menge. Ich erkannte jetzt mit Sicherheit in denselben den von Beijerinck¹⁾ beschriebenen *Azotobacter*. Verfolgt man die Kultur weiter, so beobachtet man, daß allmählich die Zellen sich mehr und mehr mit Reservestoffen, Fetttropfen anfüllen um späterhin nach der Teilung zu *Sarcina*-ähnlichen Paketen zusammenliegen zu bleiben. Fig. 1. *a, b* veranschaulicht das Gesagte. Ältere Kulturen zeigen mir die von Beijerinck beschriebene Braunfärbung¹⁾; noch später kann man beobachten, daß mit dem Erschöpfen der Nährstoffe der *Azotobacter* abstirbt, der Inhalt durch andere Bakterien resorbiert wird und nur noch die leeren Zellhäute eine Zeitlang sichtbar bleiben. Fragt man, welche *Azotobacter*-Art mir vorgelegen hat, so paßt die Beschreibung von *Azotobacter chroococcum* am besten auf meine Formen. Dabei ist noch unentschieden, ob die kleineren oder größeren genannten Formen besondere Arten darstellen, oder in denselben Entwicklungskreis hineingehören. Auffallend war mir, daß niemals

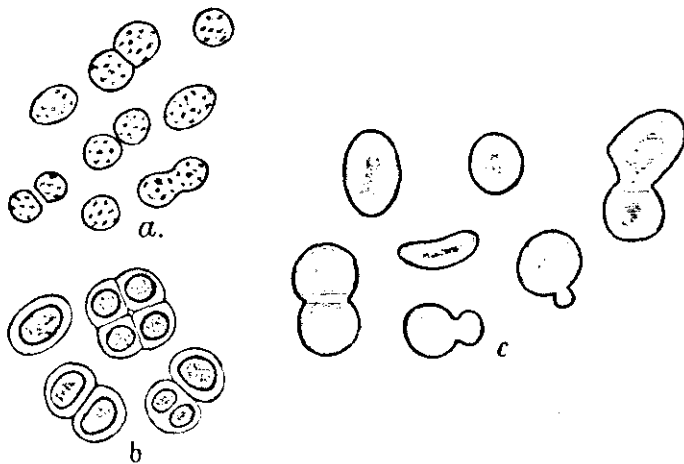


Fig. 1. *Azotobacter* Beijerinck. Vergr. 1:2400.
a nach dem Leben. *b* fixiert; Gallerthülle mit Hämalaun gefärbt.

mit wünschenswerter Sicherheit der von Beijerinck im Delfter Kanalwasser nachgewiesene *Azotobacter Agilis*²⁾ erkannt werden konnte. Möglich ist, daß die größeren, in der ersten Zeit der Kultur zu beobachtenden Individuen, dieser Art angehören, wie sie in Fig. 1c zum Teil in normaler Ausbildung, zum Teil auch in Involutionsformen dargestellt sind und daß dieselben dann später von *Chroococcum* vollkommen zurückgedrängt wurden. Wie denn auch Beijerinck angibt, daß in den Mischkulturen beider Arten häufig *Chroococcum* über die andere die Oberhand gewinnt. Genaueres anzugeben wäre erst möglich auf Grund von Untersuchungen der Begeißelung; da Beijerinck fand³⁾, daß *Chroococcum* meistens eine, *Agilis* einen Schopf von Geißeln besitzt. Auch ist darauf hinzuweisen, daß eine genaue Durcharbeitung der Artensystematik noch aussteht.

In *Reinkulturen*, die ich genau nach Beijerinck's Rezept⁴⁾ auf stickstofffreiem Agar anstellte, wuchs ebenfalls immer *Azotobacter chroococcum* (eine mir von Herrn Prof. Alfred Koch zur Verfügung gestellte Reinkultur aus Göttingen zeigte genau dasselbe Aussehen. Es sei hier auch erwähnt, daß *Azotobacter* aus anderen Weltgegenden, z. B. Buitenzorg, unter dem Mikroskop in keiner Weise zu unterscheiden war) in typischer Größe und nebenher auch einzelne, bedeutend kleinere Formen, die ich vorläufig nicht genauer

¹⁾ Bact. Ctl. II. Abt. 1901. Bd. VII. S. 581.

²⁾ Vergl. S. 6.

³⁾ Bact. Ctl. II. Abt. 1901. Bd. VII. S. 581/82.

⁴⁾ Bact. Ctl. II. Abt. Bd. VII. 1901. 514.

untersuchte. Aussehen und sonstige Eigenschaften der *Azotobacter*-Kolonien stimmten vollständig mit den Angaben anderer Autoren überein. Es handelte sich um die viel beschriebenen, schleimigen, mit Vorliebe auf der Oberfläche des Agars wuchernden Kolonien. (Siehe Fig. 2 und 2a.) In Omeliansky'schen anaeroben Apparaten, auf Agar, wuchsen dieselben nicht. Doch ertrugen sie lange Zeit, mindestens 6 Wochen, Sauerstoffmangel, ohne abzusterben. In einigen Fällen sah ich in Rohkulturen, welchen der Sauerstoff durch Pyrogallol und Kalilauge entzogen war, Formen, die auffallend an *Azotobacter* erinnerten (z. B. Formen,

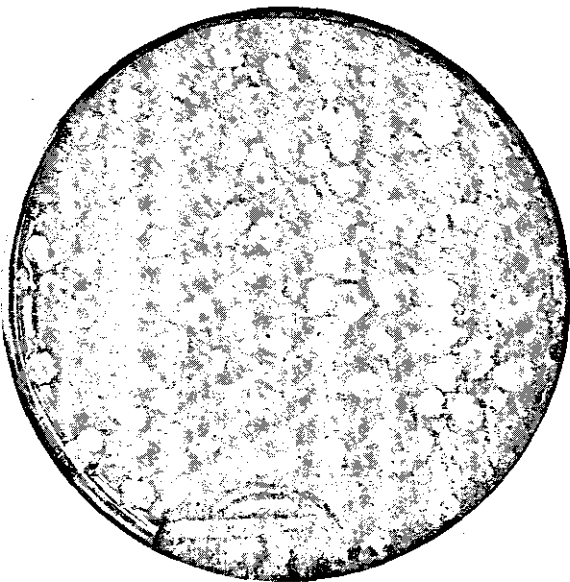


Fig. 2.

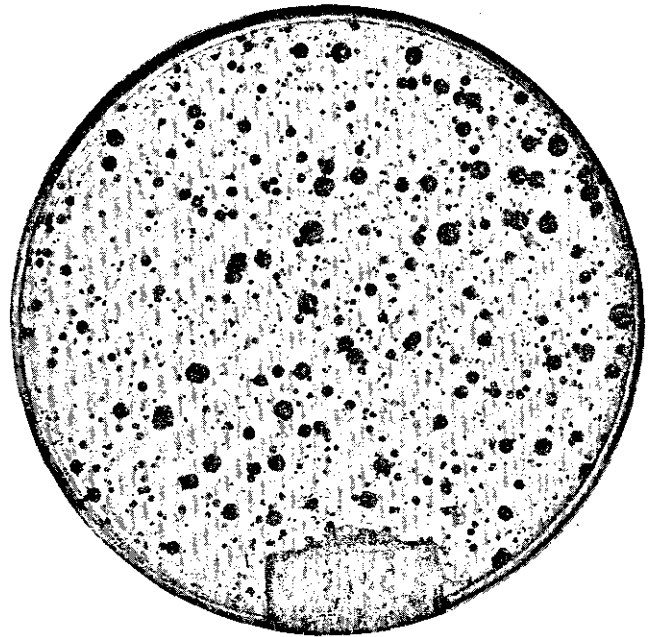


Fig. 2a.

die ähnlich waren den in Fig. 1c abgebildeten). Vielleicht steht im Einklang damit die Angabe Beijerinck's¹⁾, daß *Azotobacter Agilis* nicht die Stellen höchster, sondern mittlerer Sauerstoffspannung aufsucht.

Versuche über die Stickstoffbindung durch Reinkulturen, die ich mit den üblichen Nährsalzen anstellte, ergaben, daß eine solche zweifellos stattfindet; immerhin war das Wachstum auffallend unregelmäßig und dementsprechend auch der Stickstoffgewinn. Letzterer schwankte in einprozentigen Mannitkulturen zwischen 1 und 4 mg auf 100 ccm.

Ich gehe jetzt über zu der Besprechung der *Clostridien* in Rohkultur, die als *Anaerobien* in dieser nur durch gleichzeitige Gegenwart aerober Formen gedeihen konnten. In Schlickkulturen beobachtete ich am dritten Tage zuerst Gasblasen, während beim Impfen mit Plankton oder Algen die Gärung erst später eintrat.

Die mikroskopische Betrachtung zeigte, daß unter andern, mit Jod sich bläuenden Formen, jedenfalls *Clostridium Pasteurianum* eine wichtige Rolle spielte. In Figur 3a sieht

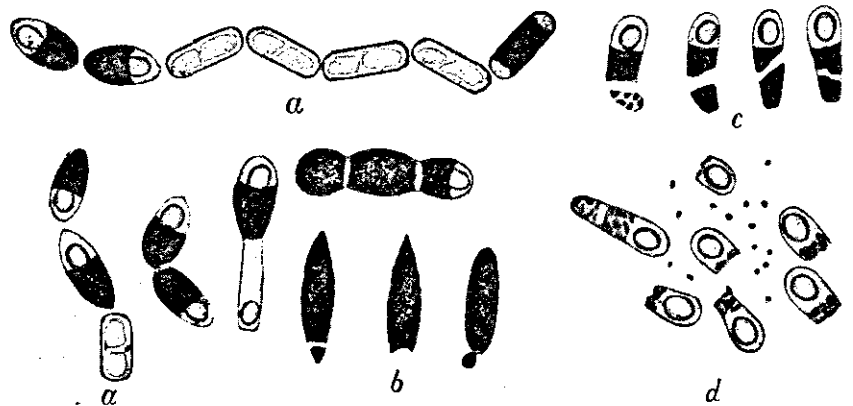


Fig. 3. *Clostridium Pasteurianum* Winogradsky. Vergr. 1:2400.
Jodpräparate. Granulose schwarz.

¹⁾ Bact. Ctl. II. Abt. Bd. VII. 1901. S. 579.

man Stäbchen, zum Teil noch granulosefrei, zum Teil schon Granulose führend, spindelförmig angeschwollen und mit der Sporenanlage an einem Ende. Dieselben zeigten meist lebhaftes Schwärmen. Fig. 3b zeigt einzelne Anomalien, so die merkwürdige Abschnürung von Kokken, Involutionsformen; zeigt ferner, daß unter Umständen auch Sporen in cylindrischen oder auch (hfg.) in keulenförmigen Stäbchen statt in Spindeln gebildet werden können. Fig. 3c und d schließlich zeigt die heranreifenden Sporen. Wie Winogradsky¹⁾ fand, sind dieselben dadurch leicht kenntlich, daß sie in der, als „Sporenkapsel“ bezeichneten Mutterzellmembran liegen bleiben. Die Entstehung dieser Kapsel, wie ich sie in meinen Kulturen beobachtet habe, zeigt Fig. 3c und d. Ich lasse dabei dahingestellt, ob das eigenartige Abbrechen des einen Zellendes (c) ein normaler Vorgang ist oder ein durch die Kulturbedingungen hervorgerufener pathologischer. Denn nach Winogradsky¹⁾ soll die Entstehung der Kapsel in etwas anderer Weise, durch Verquellen des einen Endes der Zellwand entstehen. Die Größenverhältnisse stimmen im wesentlichen auch mit Winogradsky's¹⁾ Angaben überein. Neben dem typischen *Clostridium Pasteurianum* traten auch größere

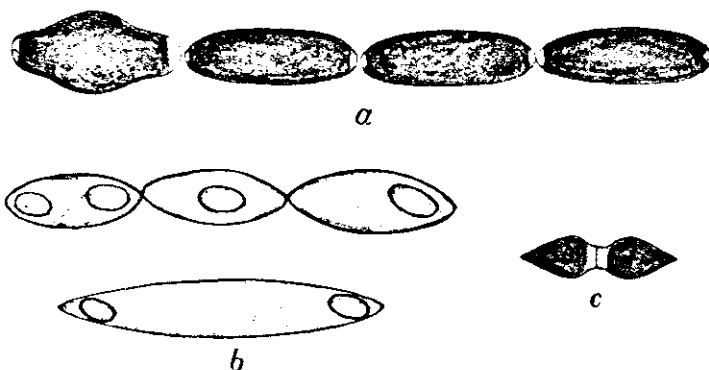


Fig. 4. a, b *Clostridium giganteum* ad int. Vergr. 1:2400. Jodpräparate; Granulose schwarz. c siehe Text, S. 42.

auftrat. Vergleiche Fig. 5d. Man sieht, daß es sich um einen *Paraplectum* handelt, welches seiner Größe

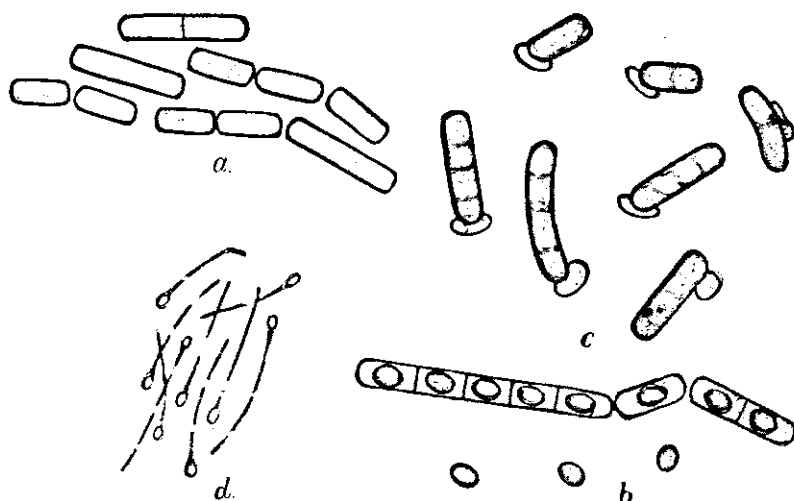


Fig. 5. Begleitbakterien von *Clostridium Pasteurianum*. Vergr. 1:2400. a, b, c *Bacillus* sp. a, b nach dem Leben. c Jodpräparat. d *Paraplectum* sp. Jodpräparat.

materials, nicht gelang, erreichte ich auf sterilen Kartoffelscheiben Mischkulturen desselben mit einem

und kleinere Granulosebakterien auf. Von großen Formen habe ich eines mit dem vorläufigen Namen *Clostridium giganteum* belegt. Fig. 4 stellt dasselbe vor und während der Sporenbildung dar. Die Sporen wurden entweder allein oder zu zweien in der Mutterzelle gebildet. Nach der Reife liegen dieselben frei, ohne Sporenkapsel. Besonders traten diese großen Formen auf in Kulturen die in sauerstofffreiem Raum gehalten wurden.

Umgekehrt, durch geringe Größe auffallend, war ein gleichfalls Granulose speicherndes Bakterium, welches wohl ausnahmslos als Begleitform von *Clostridium Pasteurianum* in Rohkultur auftrat. Vergleiche Fig. 5d. Man sieht, daß es sich um einen *Paraplectum* handelt, welches seiner Größe nach etwa mit dem von Omeliansky²⁾ studierten *Methanbakterium* der Cellulosegärung identisch sein dürfte, durch seinen Granulosegehalt andererseits sich dem *Granulobacter pectinovorum* Beijerinck's³⁾ nähert. Über die Rolle dieser zuletzt genannten Bakterien bei der Stickstoffbindung kann ich nichts sicheres aussagen, nur läßt ihr häufiges Vorkommen in meinen Kulturen vermuten, daß sie vielleicht auch den freien Stickstoff binden können. Eine Bestätigung der Angabe Winogradsky's⁴⁾ von der Stickstoffbindung durch *Clostridium Pasteurianum* gelang in folgender Weise:

Während die Reinkultur desselben mir aus nicht ersichtlichen Gründen, vielleicht wegen mangelhaften Sporen-

¹⁾ Bact. Ch. II. Abt. Bd. 9. 1902. S. 44.

²⁾ Comptus rendus T. 121. 1895. S. 744.

³⁾ Beijerinck u. van Delden. Koninklijke Akad. van Wetenschap. Te Amsterdam 1903. S. 689.

⁴⁾ l. c.

aeroben Bazillus, der Fig. 5a und c sowohl in wachsendem Zustande als auch in Sporenbildung und Sporenkeimung dargestellt ist. Es handelt sich um eine Form, die bei Jodzusatz sich intensiv braun färbt, manchmal auch einen deutlichen Stich ins Blaue zeigt. Während Reinkulturen desselben keine Stickstoffbindung erwiesen, konnte in Mischkulturen mit *Clostridium Pasteurianum* eine solche nachgewiesen werden. Offenbar ermöglichte die Gegenwart des genannten Bazillus dadurch, daß er dem *Clostridium Pasteurianum* Sauerstofffreiheit verschaffte, diesem seine stickstoffbindende Tätigkeit zu entfalten, ganz ebenso wie in den von Winogradsky¹⁾ beschriebenen Kulturen.

Es folgt nun noch die Besprechung einiger Versuchsreihen, die den Einfluß von Zeitdauer und Nährlösungskonzentration ergeben sollen.

Um den Einfluß der Kulturdauer auf die Höhe der Stickstoffbindung zu ermitteln, beschickte ich 12 geräumige Erlmeyerkolben mit je 200 ccm Nährlösung und impfte sie nach vorausgegangener Sterilisation mit geringen Mengen Schlick. Die Kulturkolben wurden bei Zimmertemperatur (20—25° bzw. 15—20°) in einem dunklen Kasten aufbewahrt, um eine möglichst gleichmäßige Entwicklung der Bakterien herbeizuführen.

Schon nach drei Tagen begann die Flüssigkeit sich zu trüben und allmählich traten auch ganz dieselben Erscheinungen ein, wie ich sie bei allen übrigen Schlickkulturen beobachtet hatte. Nach Verlauf von 16 Tagen wurden die beiden ersten Kolben analysiert, nachdem ich mikroskopisch die Gegenwart von *Azotobacter* und *Clostridium* festgestellt hatte.

Wie man aus Tabelle Nr. 12 ersieht, hat in der kurzen Zeit von 16 Tagen eine Zunahme von 5 mg Stickstoff stattgefunden. Es war in den beiden Kulturen noch eine reichliche Menge Zucker vorhanden, was man beim Zersetzen mit Schwefelsäure leicht erkennen konnte. Die beiden nächsten Kolben III und IV wurden 14 Tage später in gleicher Weise der Analyse unterworfen und ergaben einen Gewinn von ca. 6 mg Stickstoff. Man sieht also, daß die Zunahme an gebundenem Stickstoff diesmal, gegenüber Kultur I und II, eine geringere ist. Kultur V und VI, die nach weiteren 17 Tagen analysiert wurden, ergaben in Mitte 8½ mg Stickstoff, d. h. wiederum eine geringe Zunahme. Diese langsame Zunahme ließ sich weiter verfolgen bis zu der Kultur IX und X, d. h. bis zu einer Kulturdauer von ca. ½ Jahr. Dann war eine weitere Zunahme nicht mehr zu konstatieren. Es zeigt sich also, daß in den allerersten 16 Tagen bereits die Hälfte des gesamten Stickstoffgewinns erreicht war, dann nur noch eine langsame Zunahme stattfand.

Der geschilderte Verlauf der Kurve des Stickstoffgewinns erklärt sich wohl so, daß durch die starke, allmählich eintretende Säuerung die Tätigkeit der stickstoffbindenden Bakterien gehemmt wird und daß in der letzten Zeit der Kultur andere Bakterien die Oberhand gewonnen hatten; dies ergab die Beobachtung, daß der Buttersäuregeruch verschwand, statt dessen Schwefelwasserstoffgeruch mehr und mehr überhand nahm; es trieben also jedenfalls eiweißzersetzende und sulfatreduzierende Formen ihr Wesen in den alternden Kulturen.

Weiter untersuchte ich den Einfluß der Konzentration des Zuckers auf die Stickstoffbindung. Solche Versuche mit Reinkulturen von *Azotobacter* liegen bereits vor von Gerlach und Vogel²⁾. Diese fanden das Maximum der Stickstoffbindung bei Darbietung von 12 gr Dextrose im Liter.

Ich arbeitete mit Schlickrohkulturen, die mit verschiedenem Gehalt an Traubenzucker hergestellt waren. Als Stammlösung diente Ostseewasser mit den üblichen stickstofffreien Nährsalzen. Außerdem wurden zu Kolben I 2 gr Traubenzucker, zu Kolben II 4 gr, zu Kolben III 8 gr, zu Kolben IV 12 gr und zu Kolben V 16 gr Traubenzucker beigegeben. Die Versuchsdauer betrug 144 Tage. Geimpft wurde mit geringen Mengen frischgefishchem Ostseeschlick. Mit Ausnahme von Kolben V mit 16 gr Traubenzucker, konnte nach 5 Tagen ein lebhaftes Wachstum wahrgenommen werden. Einige Tage später fing auch Kultur V an sich zu trüben. Nach Verlauf von 14 Tagen zeigten die Kulturen folgendes Aussehen:

Am kräftigsten war das Wachstum in Kolben I, II und III. Auch war die Gärung in diesen drei Kulturen eine ziemlich gleichmäßige, was sich sehr schön an dem Auflösen des zugesetzten Calciumcarbonats

¹⁾ l. c.

²⁾ Bact. Ctl. Abt. II. Bd. IX. 1902. S. 819.

beobachten ließ. Bei Kultur IV mit 12 gr Traubenzucker war die Entwicklung eine geringere; jedoch in Bezug auf Kultur V mit 16 gr Traubenzucker immerhin noch lebhaft. In der letzteren trat zwar auch Wachstum und Gärung ein, letztere war aber so gering, daß es nicht zur vollständigen Auflösung von Kreide kam.

Nach Ablauf der Kulturzeit (ca. $\frac{1}{2}$ Jahr) zeigte das Mikroskop die Gegenwart von *Azotobacter* und *Clostridium*.

Die Analyse ergab folgendes:

Wie aus der Tabelle ersichtlich, hatte Kultur II mit 4 gr Dextrose den größten Stickstoffgewinn (6,7 mg) aufzuweisen. Der Zucker war noch nicht vollständig aufgebraucht. Bei Kolben I, der einen Gewinn von 5 mg Stickstoff ergab, war der Zucker nicht mehr nachzuweisen. Es ist also hier auf 1 gr Dextrose ca. 2,5 mg Stickstoff assimiliert worden. Schon bei Kolben IV mit 12 gr Traubenzucker sehen wir eine Abnahme des Stickstoffgewinns (4,27 mg), welcher letzterer bei jenem mit 18 gr noch mehr herabsinkt (2,64 mg). Aus diesen Beobachtungen können wir den Schluß ziehen, daß die Stickstoffbakterien in Rohkultur bei 1—4% Traubenzucker am kräftigsten den Stickstoff aufnehmen, während 6% bereits nachteilig wirkten. Das Maximum des Stickstoffgewinns bei Rohkulturen zeigte sich also bei weitaus höherer Konzentration als in den oben erwähnten Kulturen von Gerlach und Vogel¹⁾, was an den durchaus anderen Kulturbedingungen mitgelegen haben dürfte.

Hat sich als Hauptresultat meiner Untersuchung ergeben, daß stickstoffbindende Bakterien nicht nur in Süßwasserbecken des Festlandes, sondern auch in Meeren schwächeren und stärkeren Salzgehaltes finden, so lag die Frage sehr nahe, den Einfluß des Kochsalzes in verschiedenen Konzentrationen auf die Stickstoffbindung zu untersuchen, ein etwaiges Optimum, sowie das Maximum des Kochsalzgehaltes festzustellen.

Aus den im Anfang erwähnten Versuchen, bei welchen Meeresbakterien in Nährlösungen geimpft wurden, welche Leitungswasser als Lösungsmittel enthielten und Bakterien in Lösungen, bei welchem Ostseewasser verwandt wurde, habe ich die Erfahrung gewonnen, daß die Gegenwart geringer Mengen Natriumchlorid keinen besonderen Einfluß auf das Wachstum und die Stickstoffbindung durch *Azotobacter* und *Clostridium* ausübt.

Um nun genauer den Einfluß verschieden großer Kochsalzmengen zu prüfen, stellte ich eine Reihe Nährlösungen her, welche die gewöhnlichen Nährsalze in 100 ccm Leitungswasser enthielten. Alsdann wurden zu den verschiedenen Kulturflüssigkeiten verschiedene Mengen Kochsalz gegeben. Wie aus Tabelle Nr. 14 ersichtlich, stieg der Gehalt um je 1%, von 1% bis zur Höhe von 10%. Die Kolben wurden alsdann mit einer Spur jenes schleimartigen, an der Innenwandung der Gefäße an dieser herabhängenden Häutgens, das vorwiegend aus *Azotobacter*zellen bestand, geimpft und bei Zimmertemperatur (15—20°) aufbewahrt. Es trat bei allen Kulturen, bis inklusive der mit 6% Kochsalz beschickten, bald ein lebhaftes Wachstum ein. Ein Unterschied zwischen denselben zeigte sich insofern, als bei III und IV die Entwicklung eine kräftigere war, als in den Kulturen I, II, V und VI. Auch konnte man schon bei den beiden zuerst genannten eine deutliche Bildung des Gallertringes sehen, während I, II, V und VI nicht den geringsten Anflug eines solchen Ringes erkennen ließen. Nach 3 Wochen begann auch in Kolben VII und VIII eine schwache Entwicklung der *Azotobacter*zellen. Kultur I—VI gewährten nun auch einen gleichen mikroskopischen Anblick und unterschieden sich kaum mehr von einander. Das Wachstum in Kultur VII und VIII schritt nur langsam fort. Kolben IX und X blieben klar. Eine Vermehrung der *Azotobacter*zellen hatte somit hier nicht stattgefunden.

Mikroskopisch war in den Kulturen nur *Azotobacter* nachzuweisen.

Die analytischen Resultate finden wir auf Tabelle Nr. 14.

Wie ersichtlich, ist bei Kolben III die größte Zunahme an gebundenem Stickstoff zu verzeichnen (rund 7 mg in 100 ccm), während die übrigen eine successive Abnahme erfuhren. Bei Kultur IV finden

¹⁾ l. c.

wir, daß der Stickstoffgewinn schon um 1% gesunken ist und bei Kolben I, II, V und VI mit annähernd gleichem Stickstoffgewinn, eine weitere Abnahme von 1% stattgefunden hat. Kolben VII und zumal VIII zeigen bereits einen wesentlich geringeren Ertrag an gebundenem Stickstoff, während bei Kolben IX und X keine Stickstoffbindung nachgewiesen werden konnte.

Aus dieser Versuchsreihe folgt, daß *Azotobacter* eine derartig euryhaline Form ist, daß er durch größeren Kochsalzgehalt des Substrats jedenfalls nicht beträchtlich in seiner stickstoffbindenden Tätigkeit gehemmt werden kann; ja, es scheint sogar, daß ein Zusatz von Kochsalz förderlich für seine Entwicklung ist.

Der Übertragung dieser Resultate auf natürliche Standorte steht allerdings noch die Tatsache entgegen, daß in Meeresbecken von höherer Konzentration nicht nur der Gehalt an Kochsalz, sondern auch an den übrigen Bestandteilen des Seewassers (Magnesiumsalze etc.) steigt. Es wäre also meine Versuchsreihe noch zu ergänzen durch eine weitere, mit wechselndem Gehalt an natürlichem Seesalz.

Schließlich weise ich auch noch darauf hin, daß der mikroskopische Anblick der Zellen des *Azotobacters* in den konzentrierten Kulturen derselbe war, wie in den salzfreien. Eine Beeinflussung der Gestalt durch den osmotischen Druck der Nährlösung ist daher nicht nachzuweisen.

Anhang.

Das Vorkommen der stickstoffbindenden Bakterien an Süßwasserpflanzen.

Die Entdeckung von *Azotobacter* und *Clostridium* auf festsitzenden und treibenden Meeresalgen legte es nahe, auch Süßwasserpflanzen auf das Vorhandensein jener Bakterien zu untersuchen.

Ich stellte zu diesem Zwecke eine Reihe, mit Nährlösung (Lösungsmittel: Leitungswasser) beschickter Kolben in der bekannten Weise her und beimpfte dieselben mit Plankton, welches ich auf dem Lankener See bei Preetz gefischt hatte. Außerdem wurden *Azolla*, *Lemna minor*, *Spirogyra* und *Volvox* als Impfmateriel benutzt. Die drei erstgenannten Arten gelangten unter möglichster Vermeidung einer Infektion in die Nährlösungen. *Volvox* wurde außerdem noch einem besonderen Reinigungsverfahren unterworfen. Es geschah dies, indem eine Kolonie in ein mit Glasstöpsel versehenes, mit Leitungswasser bis zur Hälfte gefülltes steriles Fläschchen gebracht, einigemal kräftig geschüttelt und auf ein steriles Filter überführt wurde. Hierauf spülte ich dreimal gründlich mit Leitungswasser ab und impfte das Kügelchen mittelst einer vorher ausgeglühten Platinnadel in die sterile Nährlösung ein.

Ich bespreche zunächst die *Volvox*- und *Spirogyra*-Kulturen. Wie auf Tabelle Nr. 16 vermerkt, wurden dieselben am 5. August in Gang gesetzt. Während der Ferien standen sie in einem dunklen Schrank, sich selbst überlassen. Der Verlauf der Entwicklung in den einzelnen Kolben wird jedenfalls derselbe gewesen sein, wie ich ihn bei den früheren Kulturen mit Meeresplankton oder festsitzenden Algen, als Impfmateriel beschrieben habe. Jedenfalls zeigte sich Mitte Oktober, daß sämtliche geimpfte Kolben eine kräftige Entwicklung von Bakterien aufzuweisen hatten. Der charakteristische braune Gallertring ließ schon auf die Gegenwart von *Azotobacter*, das Verschwundensein der Kreide und der Geruch nach Buttersäure auf *Clostridium* schließen.

Die mikroskopische Untersuchung bestätigte die Vermutung. *Clostridium* sowohl als *Azotobacter* konnten genau mit den aus dem Meere kultivierten Bakterien identifiziert werden.

Die Analyse nach Kjeldahl ergab eine recht reichliche Anreicherung an gebundenem Stickstoff.

Wie bei allen übrigen Versuchen, bei welchen mit festsitzenden oder treibenden Algen geimpft wurde, war auch bei den Süßwasserkulturen *Azotobacter chroococcum* stets in beträchtlicher Überzahl vorhanden, obwohl auch *Clostridium Pasteurianum* ohne Schwierigkeit nachgewiesen werden konnte.

Die Kulturen mit *Azolla* und *Lemna* wurden am 23. Oktober angesetzt. Sie ergaben ebenfalls, mit Rücksicht auf die Kürze der Versuchsdauer, eine erhebliche Menge durch *Azotobacter* und *Clostridium* gebundenen Stickstoff.

Azolla, die hierbei als Impfmateriel diente, überzog die ganze Oberfläche des Teiches des Kieler botanischen Gartens, wie ein dicker, rötlich-grüner Teppich. Derselbe hatte sich während der Herbstferien aus einer kleinen Zahl von Pflänzchen entwickelt, die anfangs Juli in den Teich eingebracht waren. Dieses förmlich „explosionsartige“ Auftreten des genannten Wasserfarnes, das offenbar mit einer recht beträchtlichen Eiweißsynthese Hand in Hand ging, ließ die Vermutung nicht ungerechtfertigt erscheinen, daß diese Eiweißproduktion mindestens zum Teil mit Hilfe des auf dem *Azolla*-Pflänzchen kulturell nachgewiesenen *Azotobacter*, d. h. auf Kosten des Stickstoffs der Luft vor sich gegangen war. Um diese Vermutung zu stützen, versuchte ich auch hier den direkten mikroskopischen Nachweis des *Azotobacters* an seinem natürlichen Standort. Dasselbe gelang über Erwarten leicht.

Wurde eine *Azolla*-Wurzel unter dem Mikroskop betrachtet, so zeigte sich dieselbe umwuchert mit allen möglichen anderen Organismen; besonders fielen kleine blaugüne Schleimklümpchen auf, die vorwiegend aus der *Cyanophyceae Sphärozyga Ralfsii* bestanden. Zwischen den Zellfäden dieser Alge zeigte das Mikroskop ausnahmslos die charakteristischen, sarcina-ähnlichen Pakete von *Azotobacter*, die übrigens auch unabhängig von der *Sphärozyga*, gelegentlich zwischen den Wurzelfasern anzutreffen waren. Der Nachweis des *Azotobacters* gestaltete sich besonders dann sehr leicht, wenn man einen Teil einer *Azolla*-Wurzel mit den daran haftenden Organismen an dem Deckglas antrocknen ließ und mit Methylenblau färbte. — Dieser Nachweis fordert darum auf, künftig auch in anderen Fällen solchen explosionsartigen Auftretens von Wasserpflanzen, Wasserblüte etc. nach stickstoffbindenden Bakterien mit dem Mikroskop oder mit Hilfe von Kulturen zu fahnden.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

1. Stickstoffbindende Bakterien, deren Vorkommen auf dem Festlande seit 20 Jahren bekannt ist, sind auch als regelmäßige Bewohner der Meere zu bezeichnen.
 2. Die im Meere vorkommenden Formen konnten mit den auf dem Festlande nachgewiesenen *Azotobacter chroococcum* Beijerinck und *Clostridium Pasteurianum* Winogradsky identifiziert werden. Die morphologischen und physiologischen Eigenschaften derselben stimmten im wesentlichen überein mit jenen, welche von Winogradsky, Beijerinck und anderen Forschern beschrieben worden sind. Ich stellte außerdem fest, daß *Azotobacter* ein euryhaliner Organismus ist. Er übte noch in einer Nährlösung, die 8% Kochsalz enthielt, stickstoffbindende Tätigkeit aus.
 3. Es wurde festgestellt, daß die stickstoffbindenden Bakterien am Meeresgrunde, an festsitzenden Algen und auf Planktonorganismen vorkommen.
 4. Sie waren nachzuweisen an verschiedenen Stellen der Ost- und Nordsee, ferner im Indischen Ozean, sowohl an der afrikanischen Küste als auch im malayischen Archipel. Nebenbei wurde festgestellt, daß sie auch auf dem tropischen Festlande (Amani, Buitenzorg) im Erdboden anzutreffen sind.
 5. Anhangsweise wurde ermittelt, daß auch im Plankton von Süßwasserbecken die genannten stickstoffbindenden Bakterien weit verbreitet sind.
-

Tabelle 1.

Kulturflüssigkeit (1—4).

Ostseewasser oder Leitungswasser	100 gr
Dextrose	4 gr
K ₂ H PO ₄	0.1 gr
Mg SO ₄ + 7 H ₂ O	0.05 gr
Ca CO ₃	0.3 gr.

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Leitungswasser oder Ostseewasser	Impfmateri al	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 100 ccm
1	15. Mai—15. Juni	29	Ostseewasser	Gartenerde	7.53	1.77	6.76
2	" "	29	"	Schlick	7.35	1.70	5.65
3	" "	29	Leitungswasser	Gartenerde	6.56	1.47	5.09
4	" "	—	"	Schlick	6.06	1.70	4.36

Tabelle 2.

Kulturflüssigkeit (1—18).

Ostseewasser	200 gr
Dextrose	4 gr
K ₂ H PO ₄	0.04 gr
Mg SO ₄ + 7 H ₂ O	0.02 gr
± Ca CO ₃	0.3 gr.

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Mit oder ohne Ca CO ₃	Impfmateri al	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 200 ccm
1	8. Februar—22. April	72	+	Schlick aus der Gegend der Heulboje	22	6	16
2	" "	72	—		15	6	9
3	23. April—28. Mai	34	+		7	0.3	6.7
4	" "	34	—		1.17	0.28	0.89
5	" "	34	+		6.0	0.27	5.73
6	" "	34	—		2.9	0.23	2.67
7	20. Mai—15. Juni	21	+		3.64	0.7	2.94
8	" "	21	+		4.29	0.7	3.59
9	20. Mai—30. Juni	41	+		6.51	0.7	5.81
10	" "	41	+		4.59	0.7	3.89
11	20. Mai—25. Juli	65	+		13.72	2.87	10.85
12	" "	65	+		11.83	2.87	8.96
13	" "	65	+		11.06	2.94	8.12
14	" "	65	+		12.46	2.87	9.59
15	" "	65	+		7.77	2.87	4.90
16	" "	65	+		11.62	2.94	8.68
17	" "	65	+		6.51	0.74	5.81
18	" "	65	+		4.59	0.70	3.89

Tabelle 3. Kulturflüssigkeit (1—8).

Ostseewasser 100 gr
 Mannit 4 gr
 $K_2 H PO_4$ 0.04 gr
 $Mg SO_4 + 7 H_2 O$ 0.02 gr
 $Ca CO_3$ 0.3 gr.

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmaterial	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 100 ccm
1	20. Mai—25. Juni	35	Schlick aus der Gegend der Heulboje und des Feuerschiffes	3.66	0.60	3.06
2	" "	35		3.99	0.60	3.39
3	" "	35		2.17	0.60	1.57
4	20. Mai—25. Juli	65		14.28	3.21	11.07
5	" "	65		13.43	3.22	10.21
6	" "	65		11.13	3.22	7.91
7	" "	65		7.49	3.11	4.38
8	" "	65		10.43	3.11	7.32

Tabelle 4. Kulturflüssigkeit (1—10).

Leitungswasser 300 gr
 Dextrose 4 gr
 $K_2 H PO_4$ 0.1 gr
 $Mg SO_4 + 7 H_2 O$ 0.1 gr
 Na Cl 9 gr
 $Ca CO_3$ 0.3 gr.

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmaterial	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 300 ccm
1	5. August—7. Dezember	124	Meeresboden aus dem Hafen von Tanga, bei tiefer Ebbe.	14.93	1.92	13.01
2	" "	124	Meeresboden aus dem Hafen von Tanga, unterhalb des Kaisergartens.	12.95	1.47	11.48
3	" "	124	Meeresboden von der Hafen- einfahrt zu Tanga.	17.43	2.30	15.13
4	" "	124	Meeresboden aus dem Hafen von Tanga, 150 m vom Strande, bei tiefer Ebbe.	19.97	2.35	17.62
5	20. Oktober—8. August	46	Meeresschlick aus Java.	21.0	2.8	18.2
6	" "	46	" "	12.67	1.95	10.72
7	22. November—28. Dez.	35	Erde aus dem Garten von Buitenzorg.	14.0	7.6	6.4
8	" "	35	" "	15.0	7.6	7.2
9	" "	35	Erde aus Amani.	17.8	8.3	9.5
10	" "	35	" "	13.9	8.3	5.6

Tabelle 5.

Kulturflüssigkeit (1—12).

Ostseewasser	200 gr
Dextrose oder Mannit	4 gr
K ₂ HPO ₄	0.1 gr
Mg SO ₄ + 7 H ₂ O	0.05 gr
± Ca CO ₃	0.3 gr.

Nr. des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Mit oder ohne Ca CO ₃	Impfmaterial	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoffgewinn in 200 ccm	Mannit oder Dextrose
1	18. Mai—28. Juni	41	+	<i>Hydrolapathum sanguineum</i>	4.97	0.3	4.67	Dextrose
2	" "	41	—	"	3.10	0.3	2.80	"
3	" "	41	+	"	5.32	0.3	5.02	Mannit
4	" "	41	—	"	2.30	0.3	2.00	"
5	28. Mai—3. Juli	36	+	"	4.97	0.3	4.67	"
6		112	+	"	8.96	0.34	8.62	Dextrose
7		112	+	<i>Polysiphonia elongata</i>	7.38	0.34	7.04	"
8		112	+	<i>Cystoclonium purpurascens</i>	11.50	0.49	11.01	"
9		112	+	<i>Fucus serratus</i>	8.76	0.49	8.27	"
10		112	+	<i>Laminaria flexicaulis</i>	7.38	0.49	6.89	"
11		112	+	<i>Seestern</i>	13.02	0.49	12.53	"
12		112	+	<i>Mytilus</i>	12.03	0.49	11.54	"

Tabelle 6.

Kulturflüssigkeit (1—8).

Ostseewasser	200 gr
Mannit	3 gr
K ₂ HPO ₄	0.1 gr
Mg SO ₄ + 7 H ₂ O	0.05 gr
Na Cl	3.0 gr
Ca CO ₃	0.3 gr

Nr. des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmaterial	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoffgewinn in 200 ccm
1	15. November—12. Dezember	26	<i>Placodium coccineum</i>	6.87	1.50	5.37
2	" "	26	<i>Polyides rotundus</i>	8.07	1.50	6.57
3	" "	26	<i>Chondrus crispus</i>	6.90	1.50	5.46
4	" "	26	<i>Fucus serratus</i>	6.40	1.50	4.93
5	" "	26	<i>Halidrys quadrivalvis</i>	9.56	1.86	7.70
6	" "	26	<i>Laminaria sacharina</i>	8.50	1.86	6.65
7	" "	26	<i>Enteromorpha linza</i>	7.46	1.86	5.60
8	" "	26	<i>Porphyra laciniata</i>	7.68	1.86	5.82

Tabelle 7.

Kulturflüssigkeit (1—10).

Ostseewasser 100 gr
 Dextrose bezw. Mannit 4 gr
 $K_2 H PO_4$ 0.1 gr
 $Mg SO_4 + 7 H_2 O$ 0.05 gr
 $\pm Ca CO_3$ 0.3 gr
 Bei Kultur Nr. 5 $(NH_4)_2 SO_4$ außerdem . . 0.04 gr.

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Mit oder ohne $Ca CO_3$	Impfmateri al	Milli- gramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften und dann sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 100 ccm	Dextrose oder Mannit
1	9. Februar—22. April	72	+	Geimpft wurde mit geringen Mengen einer alten abge- gohrenen Mannitkultur, die ihrerseits mit Plankton aus der Ostsee geimpft worden war.	17	0.30	16.7	Dextrose
2	" "	72	—		10	0.30	9.72	"
3	" "	72	+		10	0.30	9.7	"
4	" "	72	—		2	0.30	1.7	"
5	" "	72	+		26	1.25	24.75	"
6	" "	72	—		3	0.20	2.8	"
7	23. April—26. Mai	33	+		6	0.21	5.79	Mannit
8	" "	33	—		1.3	0.4	0.9	"
9	" "	33	+		5.3	0.28	5.02	"
10	" "	33	—		3.0	0.23	2.77	"

Tabelle 8.

Kulturflüssigkeit (1—8).

Ostseewasser 100 gr
 Mannit bezw. Dextrose 3 gr
 $K_2 H PO_4$ 0.1 gr
 $Mg SO_4 + 7 H_2 O$ 0.05 gr
 $Ca CO_3$ 0.3 gr.

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmateri al	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 100 ccm	Mannit bezw. Dextrose
1	1. Juni—3. August	63	Geimpft wurde mit Spuren Plankton, welches in der Gegend der Heulboje gefischt worden war.	2.94	0.49	2.45	Dextrose
2	" "	63		3.99	0.49	3.50	"
3	" "	63		4.00	0.49	3.51	"
4	" "	63		2.63	0.49	2.14	"
5	" "	63		10.15	0.52	9.63	Mannit
6	" "	63		8.83	0.52	8.31	"
7	" "	63		9.21	0.52	8.69	"
8	" "	63		5.3	0.52	5.01	"

Tabelle 9. Kulturflüssigkeit (1—2).

Ostseewasser	1500 gr	Mg SO ₄	0.5 gr
Dextrose 10 bezw.	5 gr	Ca CO ₃	0.3 gr.
K ₂ H PO ₄	1 gr		

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmateri al	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 1500 ccm	10 gr bezw. 5 gr Dextrose
1	6. Juli—1. November	118	Plankton	78.0	5.5	72.5	10 gr
2	" "	118	"	43.0	5.5	37.5	5 gr

Tabelle 10. Kulturflüssigkeit (1—8).

Ostseewasser	100 gr	Mg SO ₄ + 7 H ₂ O	0.05 gr
Mannit oder Dextrose	3 gr	Ca CO ₃	0.3 gr
K ₂ H PO ₄	0.1 gr		

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmateri al	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 100 ccm	Mannit bezw. Dextrose
1	1. Juni—3. August	63	Plankton aus der Gegend der Heulboje	2.94	0.49	2.45	Dextrose
2	" "	63		3.99	0.49	3.50	"
3	" "	63		4.00	0.49	3.51	"
4	" "	63		2.63	0.49	2.14	"
5	" "	63		10.15	0.52	9.63	Mannit
6	" "	63		8.83	0.52	8.31	Mannit
7	" "	63		9.21	0.52	8.69	"
8	" "	63		5.30	0.52	5.78	"

Tabelle 11. Kulturflüssigkeit (1—6).

Ostseewasser	200 gr	Mg SO ₄ + 7 H ₂ O	0.05 gr
Mannit	3 gr	Ca CO ₃	0.3 gr.
K ₂ H PO ₄	0.1 gr		

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmateri al	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 200 ccm
1	13. November—10. Dezember	27	Plankton aus der Gegend des Feuerschiffes	6.19	0.53	5.66
2	" "	27		5.20	0.53	4.67
3	" "	27		6.09	0.53	5.56
4	" "	27		7.00	0.53	6.47
5	" "	27		8.95	0.53	8.42
6	" "	27		6.32	0.53	5.79

Tabelle 12. Kulturflüssigkeit (1—12).

Ostseewasser 200 gr
Dextrose 3 gr
K₂ H PO₄ 0.1 gr
Mg SO₄ + 7 H₂ O 0.05 gr
Ca CO₃ 0.3 gr.

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmateri al	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur.	Stickstoff- gewinn in 200 ccm
1	29. Mai — 14. Juni	16	Schlick aus der Gegend des Feuerschiffes	7.41	3.00	4.41
2	" "	16		8.46	3.00	5.46
3	29. Mai — 28. Juni	30		8.93	3.00	5.93
4	" "	30		9.32	3.00	6.32
5	29. Mai — 15. Juli	47		11.79	3.00	8.79
6	" "	47		11.03	3.00	8.03
7	29. Mai — 1. August	64		12.63	3.00	9.63
8	" "	64		12.60	3.00	9.60
9	29. Mai — 20. Oktober	144		12.60	3.00	9.60
10	" "	144		13.40	3.00	10.40
11	29. Mai — 5. Dezember	190		10.35	3.00	7.35
12	" "	190		12.84	3.00	9.84

Tabelle 13. Kulturflüssigkeit (1—5).

Ostseewasser 200 gr
K₂ H PO₄ 0.1 gr
Mg SO₄ + 7 H₂ O 0.05 gr
Ca CO₃ 0.3 gr.

Kolben 1 erhielt außerdem noch 2 gr Dextrose
" 2 " " " 4 " "
" 3 " " " 8 " "
" 4 " " " 12 " "
" 5 " " " 16 " "

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmateri al	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 200 ccm
1	3. Juni — 25. Oktober	144	Schlick aus der Gegend des Feuerschiffes	5.62	0.56	5.06
2	" "	144		7.30	0.56	6.74
3	" "	144		6.92	0.56	6.36
4	" "	144		4.83	0.56	4.27
5	" "	144		3.20	0.56	2.64

Tabelle 14.

Kulturflüssigkeit (1—10).

Leitungswasser	100 gr	Mg SO ₄ + 7 H ₂ O	0.025 gr
Mannit	3 gr	Ca CO ₃	0.3 gr.
K ₂ H PO ₄	0.05 gr		

Kolben 1 erhielt außerdem noch 1 gr Chlornatrium

"	2	"	"	"	2	"	"
"	3	"	"	"	3	"	"
"	4	"	"	"	4	"	"
"	5	"	"	"	5	"	"
"	6	"	"	"	6	"	"
"	7	"	"	"	7	"	"
"	8	"	"	"	8	"	"
"	9	"	"	"	9	"	"
"	10	"	"	"	10	"	"

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmateriel	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 100 ccm
1	3. Dezember — 25. Januar	52	Spuren einer Kahmhaut, anscheinend nur aus Azotobacterzellen bestehend	4.9	0.6	4.3
2	" "	52		5.2	0.6	4.6
3	" "	52		7.5	0.6	6.9
4	" "	52		6.1	0.6	5.5
5	" "	52		5.3	0.6	4.7
6	" "	52		5.1	0.6	4.5
7	" "	52		3.8	0.6	3.2
8	" "	52		2.9	0.6	2.3
9	" "	52		0.6	0.6	—
10	" "	52		0.58	0.6	—

Tabelle 15.

Kulturflüssigkeit (1—10).

Leitungswasser	200 gr	Mg SO ₄ + 7 H ₂ O	0.05 gr
Dextrose bezw. Mannit	4 gr	Ca CO ₃	0.3 gr.
K ₂ H PO ₄	0.1 gr		

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmateriel	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 200 ccm	Mannit bezw. Dextrose
1	5. August — 18. Oktober	74	Plankton aus dem Lankener See bei Preetz	7.96	0.46	7.50	Dextrose
2	" "	74		8.05	0.46	7.59	"
3	" "	74		6.86	0.46	6.40	"
4	" "	74		9.32	0.46	8.86	"
5	" "	74		8.56	0.46	8.10	"
6	" "	74		13.16	0.39	12.77	Mannit
7	" "	74		9.92	0.39	9.53	"
8	" "	74		10.83	0.39	10.44	"
9	" "	74		11.29	0.39	10.90	"
10	" "	74		10.72	0.39	10.33	"

Tabelle 16.

Kulturflüssigkeit (1—5).

Leitungswasser	200 gr
Dextrose bezw. Mannit	4 gr
K ₂ H PO ₄	0.1 gr
Mg SO ₄ + 7 H ₂ O	0.05 gr
Ca CO ₃	0.3 gr.

Nummer des Versuches	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Impfmaterial	Milligramm N. in der geimpften Kultur	Milligramm N. in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoff- gewinn in 200 ccm	Dextrose oder Mannit
1	5. August—18. Oktober	74	<i>Spirogyra</i>	8.42	0.46	7.96	Dextrose
2	" "	74	<i>Volvox</i>	11.23	0.39	10.84	"
3	23. Oktober—8. Dezbr.	46	<i>Azolla</i>	7.70	0.32	7.38	Mannit
4	" "	46	<i>Azolla</i>	6.93	0.37	6.56	"
5	" "	46	<i>Lemna minor.</i>	5.10	0.32	4.78	"

Die vorliegende Arbeit wurde im Sommersemester 1902, Wintersemester 1902/03, Sommersemester 1903 und Wintersemester 1903/04 im botanischen Institut der Universität Kiel angefertigt.

Ich erfülle an dieser Stelle die angenehme Pflicht, dem Leiter des Institutes Herrn Geheimrat Prof. Dr. Reinke und Herrn Prof. Dr. Benecke für die gütige Anregung und Ratschläge meinen besten Dank auszusprechen.

Thesen.

I.

Es ist bis jetzt noch nicht gelungen den Nachweis zu erbringen, daß die freilebenden Schimmelpilze befähigt sind den freien atmosphärischen Stickstoff zur Synthese von Eiweiß zu verwenden.

II.

Die Reinkulturen von Milchsäurebakterien in flüssiger Form sind zur Rahmsäuerung zwecks Butterbereitung in der Praxis des Molkereigewerbes die geeignetesten.

III.

Paraplectrum foetidum spielt bei der Käsereifung eine wesentliche Rolle.

Vita.

Ich, Joseph Keutner, katholischer Konfession, Sohn des verstorbenen Kaufmanns J. H. Keutner, wurde am 8. August 1875 zu Rüdesheim a. Rh. geboren. Zu Ostern 1891 kam ich auf die Realschule zu Mainz, welche ich Ostern 1894 verließ, um mich der Pharmazie zu zuwenden. Nach beendeter Lehr- und Konditionszeit bezog ich die Universität Münster, alsdann die Universität Leipzig und setzte im Sommersemester 1901 mein Studium in Kiel fort. Am 5. Juni 1902 bestand ich das pharmazeutische Staatsexamen und am 4. Juni 1904 das Examen rigorosum. — Ich arbeitete im chemischen Laboratorium der Universität Münster und Leipzig, im chemischen Laboratorium und botanischen Institut der Universität Kiel.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Münster: Salkowski. In Leipzig: Beckmann, Boehm, A. Fischer, Ostwald, Pfeffer, Wiener, Wislicenus.

In Kiel: Benecke, Biltz, Claisen, Deussen, Falck, Fischer, Lenard, Martius, Nordhausen, Reinke, Rügheimer, Seelig.

Ihnen allen sei an dieser Stelle mein herzlichster Dank ausgesprochen.

Inst. f. Meereskunde, Kiel



000000296234